

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie et Agro-Ecologie

Laboratoire des Sciences Animales & Recherche en Biobanking
Laboratoire de Biotechnologie de Productions Végétales

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

Etude de la fragmentation de l'ADN spermatique dans l'infertilité masculine

Présenté par :

M^{lle} RAHMANE Sirine & M^{lle} TAMINDJOUTE Iness

Date de soutenance : 10/07/2025

Devant le Jury :

Mme BOUKENAOUI N.	MCA	ISV. USD-Blida 1	Présidente
Mme TARZAALI D.	MCA	ISV. USD-Blida 1	Examinatrice
Mme BENAZOUZ F.	MAA	USD-Blida 1	Promotrice
Mme BENSAIDI A.	BIOLOGISTE	HMEA	Co-Promotrice

Session 2024 / 2025

Remerciements

Avant tout, nous voudrions exprimer notre gratitude au bon Dieu, le Tout-Puissant et le Miséricordieux, pour la force et la patience qu'il nous a accordés pour mener à bien nos études et achever ce travail.

Un grand merci à notre promotrice **Mme BENAZOUZ Fella** maître assistante A au sein de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Saad Dahlab Blida, pour son aide précieuse et ses conseils avisés, sa présence a été essentielle pour mener à bien ce travail.

Nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude à notre Co-promotrice **Mme BENSAIDI Amina** pour son accompagnement tout au long de notre stage.

Nous remercierions les membres du jury **Mme BOUKENAOUI Nouria** et **Mme TARZAALI Dalila** d'avoir accepté de consacrer du temps pour juger notre modeste travail.

Nos vifs remerciements vont également à l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur disponibilité et leur accompagnement durant la période de notre stage particulièrement **Mme BASSAID Ikram** et **Mme HANOUN Sana**.

Nos remerciements à Monsieur le Directeur général de l'hôpital militaire de la mère et l'enfant - Cheraga, **Générale KOUACHI Tarek** ainsi qu'au **Colonel MECHICHE Ahmed**, pour nous avoir permis d'effectuer notre stage dans de bonnes conditions, nous remercions également la Cheffe du service de PMA **Colonel CHAALA Yousra** et le Chef d'unité Monsieur **ATIR Mourad** pour leur accueil.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude à tous nos enseignants de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, pour leur enseignement, leur professionnalisme et leur engagement à nous transmettre leur savoir et leur passion pour la science.

À toutes et à tous, nos sincères remerciements.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À mes parents, pour vos sacrifices silencieux et votre amour inconditionnel.

À ma grande famille Pour votre amour et votre soutien sans faille.

À mes amis les plus proches, pour leur présence et leur soutien durant les moments difficiles de ce parcours.

À ma binôme Sirine, pour ta collaboration précieuse et ton engagement total.

À la mémoire de mon oncle Karim parti trop tôt... de mes grands-parents maternels et de mon grand-père paternel. Que Dieu les accueille dans Son vaste paradis.

Enfin, à moi-même pour avoir cru en moi, et pour n'avoir jamais baissé les bras durant ces 17 ans d'études.

Pour que ce travail soit un premier pas vers de nouveaux horizons.

TAMINDJOUTE INESS

Dédicaces

Louange à Dieu, le Tout, pour Sa sagesse, Sa lumière et Sa miséricorde. C'est grâce à Lui que j'ai pu avancer avec force, patience et espoir. Alhamdulillah pour chaque étape, chaque épreuve et chaque réussite.

À mon père, mon héros, mon repère éternel, À toi, qui as été la force silencieuse derrière chacun de mes pas. Ton regard fier, ton amour discret mais immense, tes sacrifices innombrables... tout cela a été mon moteur, mon soutien, mon courage dans les moments de doute comme dans les instants de joie. Dans tes gestes simples, dans ton regard, dans ton courage silencieux, j'ai puisé l'amour, la force et la persévérance. Aujourd'hui, alors que tu fais face à la maladie avec autant de dignité et de courage, je ne peux que prier pour toi de tout mon cœur. Que Dieu te guérisse, te soulage, et t'accorde une longue vie pleine de paix, de sérénité et de santé. Puisse Dieu te garder en bonne santé et combler ta vie de paix et de bonheur. Tu es et tu resteras ma plus belle force dans ce monde.

À ma précieuse maman, Tu es la source de mon courage et de ma persévérance. Ton amour inconditionnel, tes prières silencieuses et ton cœur immense m'ont accompagnée à chaque pas. Qu'Allah te comble de santé et de sérénité. Je t'aime plus que les mots ne puissent le dire.

À mes frères Lotfi et Mohamed, pour votre présence constante, vos conseils, votre soutien et votre affection. Vous êtes des piliers solides dans ma vie, et je vous en suis profondément reconnaissante. **À ma sœur Selma**, dont la douceur, la générosité et l'amour m'ont toujours apporté paix et réconfort. Merci de croire en moi et de m'accompagner avec tant d'amour. Je suis chanceuse de vous avoir.

À ma binôme Inès, Merci d'avoir été bien plus qu'une simple partenaire de travail. Ton sérieux, ta bienveillance, ta patience et ton sourire dans les moments de stress ont fait toute la différence. Travailler avec toi a été une expérience enrichissante et pleine de complicité. Nous avons avancé ensemble, dans les doutes comme dans les réussites, et c'est cette union qui a donné à ce mémoire toute sa richesse. Merci d'avoir été cette partenaire unique, sur qui j'ai toujours pu compter, et qui restera gravée dans ma mémoire avec gratitude.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude **à Mme BENSAIDI, ma co-promotrice**, pour son accompagnement au laboratoire, sa bienveillance, sa disponibilité et ses conseils précieux, ainsi qu'à **Mme BENAZOUZ, ma promotrice**, pour son encadrement rigoureux, ses remarques constructives et son soutien tout au long de ce travail. Leur accompagnement a été essentiel à la réalisation de ce mémoire.

À mes chers camarades de spécialité BPM, promo 2025, merci pour ces années de complicité, d'entraide et de beaux souvenirs.

RAHMANE SIRINE.

Résumé

Le rôle de la fragmentation de l'ADN spermatique dans l'étude de la fertilité masculine, du développement embryonnaire et de la grossesse suscite un intérêt croissant dans le domaine de la recherche reproductive. L'objectif de notre étude est d'évaluer l'impact de la fragmentation de l'ADN spermatique sur les paramètres spermatiques et les résultats des techniques de procréation médicalement assistée (PMA).

Il s'agit d'une étude rétro-prospective descriptive de type analytique, réalisée à partir de 30 dossiers médicaux de patients suivis pour infertilité masculine. Le recueil des dossiers a été fait au laboratoire de PMA de l'Hôpital Militaire de la Mère et de l'Enfant de Cheraga.

L'âge moyen des patients était de 40,77 ans, la majorité se situant dans la tranche de 31-40 ans, 60% ne présente aucun antécédents personnel et la durée moyenne de l'infertilité était de 4,6 ans $\pm$ 2,58 ans. Près de la moitié des patients étaient tabagiques. Concernant le spermogramme, le volume, la vitalité, la concentration et la morphologie présentaient des valeurs dans les normes. La moyenne de l'indice de fragmentation d'ADN (DFI) était de 22,03% avec 13,3% des patients présentant un DFI élevé $>30\%$. Le taux moyen de fécondation par Injection Intracytoplasmique de Spermatozoïdes (ICSI) était de 57,58%, avec 34,7% des couples ayant obtenu une grossesse sachant que la majorité des embryons étaient de qualité B.

Notre étude a mis en évidence plusieurs résultats significatifs, nous avons constaté une corrélation inverse significative entre le DFI et la mobilité progressive des spermatozoïdes ($r = -0,57$; $P = 0,001$). Le tabagisme s'est révélé être un facteur significativement associé à l'augmentation du DFI ($P = 0,039$). Par ailleurs, un DFI élevé était significativement associé à un taux de fécondation réduit ($P = 0,013$) ainsi qu'avec une qualité embryonnaire altérée de grade C et D ($P = 0,025$). Par contre, aucune association significative n'a été démontrée entre le DFI et l'obtention de grossesse, suggérant que dans notre échantillon, la qualité génomique du spermatozoïde n'est pas considérée comme étant un facteur déterminant du succès reproductif.

Mots clés : Infertilité masculine, Spermogramme, Fragmentation de l'ADN spermatique, Procréation médicalement assistée.

Abstract

The role of sperm DNA fragmentation in the study of male fertility, embryonic development, and pregnancy is attracting growing interest in the field of reproductive research. The aim of our study is to evaluate the impact of sperm DNA fragmentation on sperm parameters and the outcomes of assisted reproductive technology (ART).

This is a descriptive, retro-prospective, analytical study based on 30 medical records of patients treated for male infertility. The records were collected from the assisted reproductive technology laboratory at the Cheraga Military Mother and Child Hospital.

The average age of the patients was 40,77 years, with the majority in the 31-40 age group. Sixty percent had no personal history of infertility, and the average duration of infertility was 4,6 years $\pm$ 2,58 years. Nearly half of the patients were smokers. Sperm analysis showed that volume, motility, concentration, and morphology were within normal ranges. The average DNA fragmentation index (DFI) was 22,03%, with 13,3% of patients having a high DFI >30%. The average fertilization rate by Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) was 57,58%, with 34,7% of couples achieving pregnancy, knowing that the majority of embryos were of B quality.

Our study revealed several significant findings. We observed a significant inverse correlation between DFI and progressive sperm motility ($r = -0,57$; $P = 0,001$). Smoking was found to be a factor significantly associated with increased DFI ($P = 0,039$). Furthermore, high DFI was significantly associated with reduced fertilization rates ($P = 0,013$) and impaired embryo quality grades C and D ($P = 0,025$). However, no significant association was found between DFI and pregnancy outcome, suggesting that in our sample, sperm genomic quality is not considered a determining factor in reproductive success.

Keywords: Male infertility, Spermogram, Sperm DNA fragmentation, Assisted reproductive technology,

ملخص

يحظى دور تجزئة الحمض النووي للحيوانات المنوية في دراسة الخصوبة الذكورية وتطور الأجنة والحمل باهتمام متزايد في مجال أبحاث الإنجاب. تهدف دراستنا إلى تقييم تأثير تجزئة الحمض النووي للحيوانات المنوية على معايير الحيوانات المنوية ونتائج تقنيات المساعدة على الإنجاب (PMA).

هذه دراسة وصفية تحليلية من نوع استعادية واستباقية، أجريت على أساس 30 ملفاً طبياً لمرضى تمت متابعتهم بسبب العقم عند الرجال. تم جمع الملفات في مختبر PMA في مستشفى الأم والطفل العسكري في شراكة.

كان متوسط عمر المرضى 40,77 سنة، وكان معظمهم في الفئة العمرية 31-40 سنة، و60% منهم لم يكن لديهم أي تاريخ شخصي، وكان متوسط مدة العقم 4,6 سنة $\pm$ 2,58 سنة. كان ما يقرب من نصف المرضى مدخنين. فيما يتعلق بالفحص المجهرى للسائل المنوي، كانت القيم المتعلقة بالحجم والحيوية والتركيز والشكل ضمن المعدلات الطبيعية. بلغ متوسط مؤشر تجزئة الحمض النووي 22,03% (DFI)، مع 13,3% من المرضى يعانون من ارتفاع مؤشر $DFI > 30\%$ ، بلغ متوسط معدل الإخصاب عن طريق الحقن المجهرى للحيوانات المنوية 57,58% (ICSI)، مع حصول 34,7% من الأزواج على حمل، مع العلم أن غالبية الأجنة كانت من النوعية B.

أظهرت دراستنا عدة نتائج مهمة، فقد لاحظنا وجود علاقة عكسية مهمة بين DFI وحركة الحيوانات المنوية التقدمية ($r = 0,57$ ؛ $P = 0,001$). وقد تبين أن التدخين عامل مرتبط بشكل كبير بزيادة DFI ($P = 0,039$) من ناحية أخرى، كان ارتفاع DFI مرتبطاً بشكل كبير بانخفاض معدل الإخصاب ($P = 0,013$) وكذلك بتدهور جودة الأجنة من الدرجة C و D ($P = 0,025$). ومع ذلك، لم تثبت أي علاقة ذات دلالة إحصائية بين مؤشر DFI والحمل، مما يشير إلى أن الجودة الجينومية للحيوانات المنوية في عينتنا لا تعتبر عاملاً حاسماً في نجاح الإنجاب.

الكلمات المفتاحية: العقم عند الذكور، تجزئة الحمض النووي للحيوانات المنوية، تقنية المساعدة على الإنجاب، تحليل السائل المنوي

Liste des figures

Figure 1: Différenciation des voies génitales internes	4
Figure 2: Schéma général de l'appareil génital masculin. (a) : vue frontale. (b) : coupe sagittale .5	5
Figure 3: Anatomie du testicule.	6
Figure 4: Coupe transversale de tube séminifère colorée par la méthode de Van Gieson au microscope optique. (Objectif X 40).....	8
Figure 5: Etapes de la spermatogénèse.....	10
Figure 6: Modifications des organites intracellulaires des spermatozoïdes pendant la spermiogénèse.....	11
Figure 7: Représentation schématique du mécanisme endocrinien régulant le système reproducteur masculin	12
Figure 8: Structure d'un spermatozoïde normal	14
Figure 9 : Exemples d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes.....	19
Figure 10: Organisation de l'ADN dans les spermatozoïdes de mammifères.....	24
Figure 11: Visualisation microscopique d'un spermatozoïde vivant (A) et mort (B). (Photo originale).....	34
Figure 12: Répartition des patients en fonction de l'âge.....	39
Figure 13: Répartition des patients en fonction du type d'infertilité	39
Figure 14: Répartition des patients en fonction de la durée de l'infertilité	40
Figure 15: Répartition des patients en fonction des antécédents cliniques	40
Figure 16: Répartition des patients selon leurs statuts tabagiques.....	41
Figure 17: Répartition des patients selon le niveau d'exposition professionnelle aux facteurs délétères pour la fertilité.	41
Figure 18: Répartition des patients selon le résultat du spermogramme	42
Figure 19: Répartition des patients selon le volume spermatique	42
Figure 20: Répartition des patients selon la mobilité.....	43
Figure 21: Répartition des patients selon la concentration.....	43
Figure 22: Répartition des patients selon la vitalité	44
Figure 23: Répartition des patients selon la morphologie	44
Figure 24: Répartition des patients selon l'indice d'anomalie multiple	45
Figure 25: Répartition des patients en fonction du seuil de la fragmentation de l'ADN (DFI) ...	45
Figure 26: : Répartition des patientes selon le taux de fécondation.....	46
Figure 27: Répartition des patientes selon la qualité embryonnaire	46
Figure 28: Corrélation du DFI avec l'âge des patients.....	47
Figure 29: Corrélation entre la mobilité progressive (a+b) en fonction du DFI.....	49
Figure 30: Corrélation entre le volume et le DFI.....	49
Figure 31: Papier pH	74

Figure 32: Microscope optique	74
Figure 33: Colorant l'éosine et nigrosine	74
Figure 34: Bain marie	74
Figure 35: Etuve	74
Figure 36: Pot de recueil	74
Figure 39: KIT halosperm G2 commercialisé par halotech	75
Figure 37: Kit Sil Select Plus	75
Figure 38: Kit Ral 555 (Spermoscan).....	75
Figure 40: Halo large (flèche vert foncé) et halo moyen (flèches vert clair) : Spermatozoïdes sans fragmentation de l'ADN spermatique,	75

Liste des tableaux

Tableau 1: Synthèse des différentes anomalies spermatiques au spermogramme-spermocytogramme selon les seuils de l'OMS 2021 (WHO, 2021).....	15
Tableau 2 : Répartition des moyennes d'âge selon les seuils de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI)	48
Tableau 3: Répartition des patients selon les moyennes de la durée d'infertilité selon les seuils de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI).....	48
Tableau 4: Répartition des patients selon la mobilité progressive et le DFI	50
Tableau 5: Répartition des patients selon le volume spermatique et le DFI	50
Tableau 6: Répartition des patients selon la concentration et le DFI	51
Tableau 7: Répartition des patients selon la morphologie et le DFI.....	51
Tableau 8: Répartition des patients selon l'indice d'anomalie et le DFI	52
Tableau 9: Répartition des patients selon le tabagisme et le DFI	53
Tableau 10: Répartition des patients selon le taux de fécondation et le DFI	53
Tableau 11: Répartition des patients selon la qualité embryonnaire et le DFI	54
Tableau 12: Répartition des patients selon la grossesse et le DFI	54

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMH	Hormone anti-mullérienne
AOT	Acridine orange test
CASA	Computer assisted sperm analysis
DFI	DNA fragmentation index
FIV	Fécondation in vitro
FSH	Follicle stimulating hormone
GnRH	Gonadotrophin releasing hormone
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection
IMSI	Intracytoplasmic morphologically sperm injection
IUI	Insémination intra-utérine
LH	Luteinizing hormone
OMS	Organisation mondiale de la santé
PMA	Procréation médicalement assistée
PICSI	Physiological intracytoplasmic sperm injection
SCD	Sperm Chromatin Dispersion
SCSA	Sperm chromatin structure assay
Spermatogonie Ad	Spermatogonie A dark
Spermatogonie Ap	Spermatogonie A pale
TP1 et TP2	Transition proteins 1 and 2
TUNEL	Terminal uridine nick-end labeling
WHO	World Health Organization

Sommaire

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUE	3
I.1. Rappels embryologiques	3
I.1.1. Déterminisme sexuel	3
I.1.2. Développement des testicules	3
I.2. Anatomie de l'appareil génital masculin	5
I.2.1. Pénis	5
I.2.2. Testicules	5
I.2.3. Voies génitales	6
I.2.4. Glandes annexes	7
I.3. Histologie du testicule	7
a) Cellules de Leydig	8
b) Cellules de Sertoli	9
I.4. Spermatogenèse	9
I.5. Régulation de la spermatogenèse	12
I.6. Structure du spermatozoïde	13
I.7. Physiopathologie de la fertilité masculine	15
I.7.1. Anomalies spermatiques	15
I.7.2. Etiologies de l'infertilité masculine	15
I.8. Exploration fonctionnelle de l'infertilité	16
I.8.1. Évaluation de l'échantillon de sperme	17
I.9. TECHNIQUES DE PMA	20
I.9.1. Techniques de procréation médicalement assistée	20
a) Insémination intra-utérine (IUI)	21
b) Fécondation in vitro (FIV)	21
c) Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI)	21
d) Test génétique préimplantatoire (PGT)	21
I.9.2. Techniques de sélection des spermatozoïdes	21

I.9.3.	Cryoconservation du sperme	23
I.10.	Structure de l'ADN spermatique et mécanismes de fragmentation.....	23
I.10.1.	Structure de l'ADN spermatique	23
I.10.2.	Hypercompaction de la chromatine	23
I.10.3.	Télomères dans l'infertilité masculine	25
I.10.4.	Fragmentation de l'ADN spermatique	25
CHAPITRE II :	MATERIEL ET METHODES	31
II.1.	Objectif de l'étude.....	31
II.2.	Description de l'étude.....	31
II.3.	Lieu et période de l'étude	31
II.4.	Population d'étude.....	31
II.4.1.	Critères d'inclusion.....	31
II.4.2.	Critères d'exclusion	31
II.5.	Matériel.....	31
II.5.1.	Matériel biologique	31
II.5.2.	Matériel non biologique	31
II.6.	Méthodes.....	31
II.6.1.	Anamnèse	31
II.6.2.	Spermogramme.....	32
II.6.3.	Spermocytogramme	35
II.6.4.	Test de migration-survie (TMS)	35
II.6.5.	Technique de Sperm Chromatin Dispersion (SCD).....	36
II.6.6.	Analyse statistique	37
CHAPITRE III :	RESULTATS ET DISCUSSION	39
III.1.	Résultats	39
III.1.1.	Analyse descriptive	39
III.1.2.	Corrélation entre l'âge et la fragmentation de l'ADN spermatique.....	47
III.1.3.	Corrélation entre la mobilité progressive et la fragmentation de l'ADN spermatique	49
III.1.4.	Corrélation entre le volume et fragmentation de l'ADN spermatique.....	49

III.2. Discussion générale	55
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	63
ANNEXES	74

Glossaire

Aspermie : c'est l'absence totale de sperme lors de l'éjaculation, due à une incapacité à transporter le sperme (anéjaculation) ou à éjaculer dans le sens antérograde, ce qui est associé à la stérilité. Les deux principales causes d'aspermie sont l'éjaculation rétrograde et l'obstruction du canal éjaculatoire (Xie *et al.*, 2017).

Asthénozoospermie : c'est une cause fréquente d'infertilité masculine, définie par une mobilité des spermatozoïdes inférieure à 40 % ou inférieure à 32 % avec une mobilité progressive (Zhu *et al.*, 2023).

Azoospermie : c'est l'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat, sur 2 examens successifs (idéalement à au moins 2,5/3 mois d'intervalle). Ce diagnostic est confirmé par la centrifugation d'un échantillon de sperme à 3000 g pendant 15 minutes (Faix *et al.*, 2023).

Hyperspermie : définie comme un volume séminal supérieur à 6,3 ml, est un état qui peut avoir un impact significatif sur la fertilité masculine en diluant la concentration des spermatozoïdes, ce qui peut provoquer une fécondabilité réduite (Hartanto *et al.*, 2024).

Hypospermie : caractérisée par un volume de sperme inférieur à 2 ml, représente un élément majeur de l'infertilité masculine, touchant près de 8 à 12 % des couples dans le monde. Cette maladie peut avoir plusieurs origines, y compris des anomalies anatomiques, des éléments génétiques et des infections (Pandit & Pandey, 2024).

Leucospermie : Selon l'OMS, on parle de leucospermie lorsque la concentration de globules blancs dans l'éjaculat est supérieure à 1×10^6 . Elle résulte souvent d'infections de la prostate et des vésicules séminales, déclenchant une augmentation significative des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en raison de mécanismes de défense impliquant le NADPH (Dutta *et al.*, 2024).

Liquéfaction : c'est le processus par lequel le sperme, initialement sous forme de gel épais au moment de l'éjaculation se transforme en un liquide fluide après un certain temps (30 à 60 minutes)

Nécrozoospermie : est une affection rare caractérisée par la présence de spermatozoïdes non viables dans l'éjaculat, qui touche environ 0,2 % à 3,4 % des cas d'infertilité masculine. Cette condition peut nuire considérablement à la fertilité, car une viabilité des spermatozoïdes inférieure à 75 % est liée à une diminution des probabilités de conception (Boursier *et al.*, 2022).

Normozoospermie : sperme dont les paramètres sont conformes aux valeurs de références de l'OMS (WHO, 2021).

Oligospermie : numération de spermatozoïdes inférieurs à 15 millions par ml ou inférieur à 39 millions par éjaculat. On parle d'oligospermie sévère lorsque la numération des spermatozoïdes est inférieure à 5 millions par ml et extrême si inférieur à 1 millions par ml.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'infertilité est définie comme l'incapacité à concevoir après 12 mois de relations sexuelles régulières non protégées. Elle constitue un véritable enjeu de santé publique et est perçue comme une pathologie à part entière **(WHO, 2021)**.

Il n'existe pas de statistiques fiables sur la prévalence mondiale de l'infertilité, bien que les estimations indiquent qu'environ 8 à 12 % des couples dans le monde ont des problèmes de fertilité. La classification générale des causes d'infertilité indique que l'origine se trouve dans le facteur reproductif masculin (30 %), dans le facteur reproductif féminin (40-55%) et dans le facteur combiné (10-20%) ; 10 à 15 % restent inexplicables **(Pandit & Pandey, 2024)**.

Par ailleurs, la qualité générale du sperme a connu une baisse constante dans le monde. À l'instar des observations rapportées dans plusieurs pays occidentaux et asiatiques, une diminution notable de la qualité spermatique a également été observée chez les hommes nord-africains, en raison de divers facteurs, tels que les changements de mode de vie, la toxicité environnementale et l'apport alimentaire **(Bahri *et al.*, 2021)**.

Jusqu'à récemment, l'évaluation de la fertilité masculine se basait principalement sur l'examen des paramètres classiques du sperme, tels que le nombre, la mobilité, la forme et la vitalité des spermatozoïdes. Cependant, ces normes ne sont pas toujours suffisantes pour élucider certains cas d'échec de fécondation ou d'absence de grossesse, en particulier dans le cadre de l'assistance médicale à la procréation (AMP) **(Agarwal *et al.*, 2023)**.

Notre étude a pour objectif principal d'évaluer l'impact de la fragmentation de l'ADN spermatique sur les paramètres spermatiques et les résultats de la procréation médicalement assistée. Il s'agira également d'explorer l'association entre le DFI et différents facteurs cliniques et comportementaux (tabagisme, antécédents médicaux) ainsi que son influence potentielle sur la qualité embryonnaire, le taux de fécondation et l'obtention d'une grossesse.

Dans un premier temps, nous aborderons l'anatomie et la physiologie de la reproduction et les principales causes d'infertilité chez l'homme. Dans le second chapitre, nous y décrirons le matériel biologique ainsi que les méthodes utilisées.

Dans un troisième temps, dans le but de répondre aux problématiques soulevées concernant une relation observée entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et les échecs des techniques en PMA, nous présenterons les résultats obtenus avec une discussion les justifiant.

Enfin, dans le dernier chapitre, une conclusion générale avec des perspectives futures pour clôturer ce travail.

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Rappels embryologiques

Les systèmes génitaux précoces des deux sexes sont similaires, c'est pourquoi la première phase du développement génital est appelée le stade indifférencié du développement sexuel (**Rey et al., 2020**).

Les gonades (testicules et ovaires) sont les organes qui produisent les cellules reproductrices (spermatozoïdes et ovocytes). Elles sont dérivées de trois sources :

- Le mésothélium (épithélium mésodermique) recouvrant la paroi abdominale postérieure
- Le mésenchyme sous-jacent (tissu conjonctif embryonnaire)
- Les cellules germinales primordiales (premières cellules sexuelles indifférenciées)

Initialement composées uniquement de cellules somatiques, les gonades sont par la suite colonisées par les cellules germinales primordiales (CGP). Ces dernières apparaissent dans l'épiblaste sous l'influence du facteur de transcription SOX17 dès le 12^e jour de développement. Les CGP migrent d'abord en dehors de l'embryon vers l'allantoïde, puis elles migrent à l'intérieur de l'embryon vers les deux crêtes génitales. Une fois sur place les CGP se multiplient par mitose et forment avec d'autres cellules, les cordons sexuels de l'ébauche gonadique indifférenciée (**Chen et al., 2019**).

I.1.1.Déterminisme sexuel

La différenciation sexuelle génitale est un processus complexe par lequel l'embryon, initialement indifférencié, développe progressivement les caractéristiques sexuelles mâles ou femelles. La sphère de transformation comprend les gonades, les voies génitales humaines et les ébauches des organes génitaux externes humains et est basée sur une série d'événements génétiques et hormonaux (**Rey et al., 2020**).

En commençant par la fécondation, le sexe chromosomique de l'embryon est déterminé par l'association des chromosomes sexuels (XX ou XY) des gamètes parentaux. Aucune différence sexuelle ne peut être observée dans les gonades avant la 6^e semaine de développement embryonnaire, les gonades des individus XX ou XY sont identiques en apparence et sont appelées gonades indifférenciées. Le développement d'un phénotype masculin nécessite un chromosome Y fonctionnel, tandis que deux chromosomes X sont requis pour le développement du phénotype féminin (**Nef et al., 2019 ; Keith et al., 2019**).

I.1.2.Développement des testicules

Le développement sexuel repose sur une fine orchestration de facteurs génétiques et hormonaux, qui façonnent progressivement le phénotype sexuel. Le gène SRY (Sex-determining Region Y) codant pour le facteur déterminant le testicule TDF (Testis-Determining Factor), agit comme un interrupteur qui dirige le développement de la gonade indifférente en un testicule. Le SRY induit

l'expression du facteur de transcription SOX9 qui est essentielle à la différenciation des cellules de Sertoli dans les testicules, ces cellules produisent une glycoprotéine, l'hormone anti-müllérienne (AMH) qui entraîne la régression des canaux para-mésonephrotiques de Müller (**Titi-Lartey & Khan, 2023**) (figure 1).

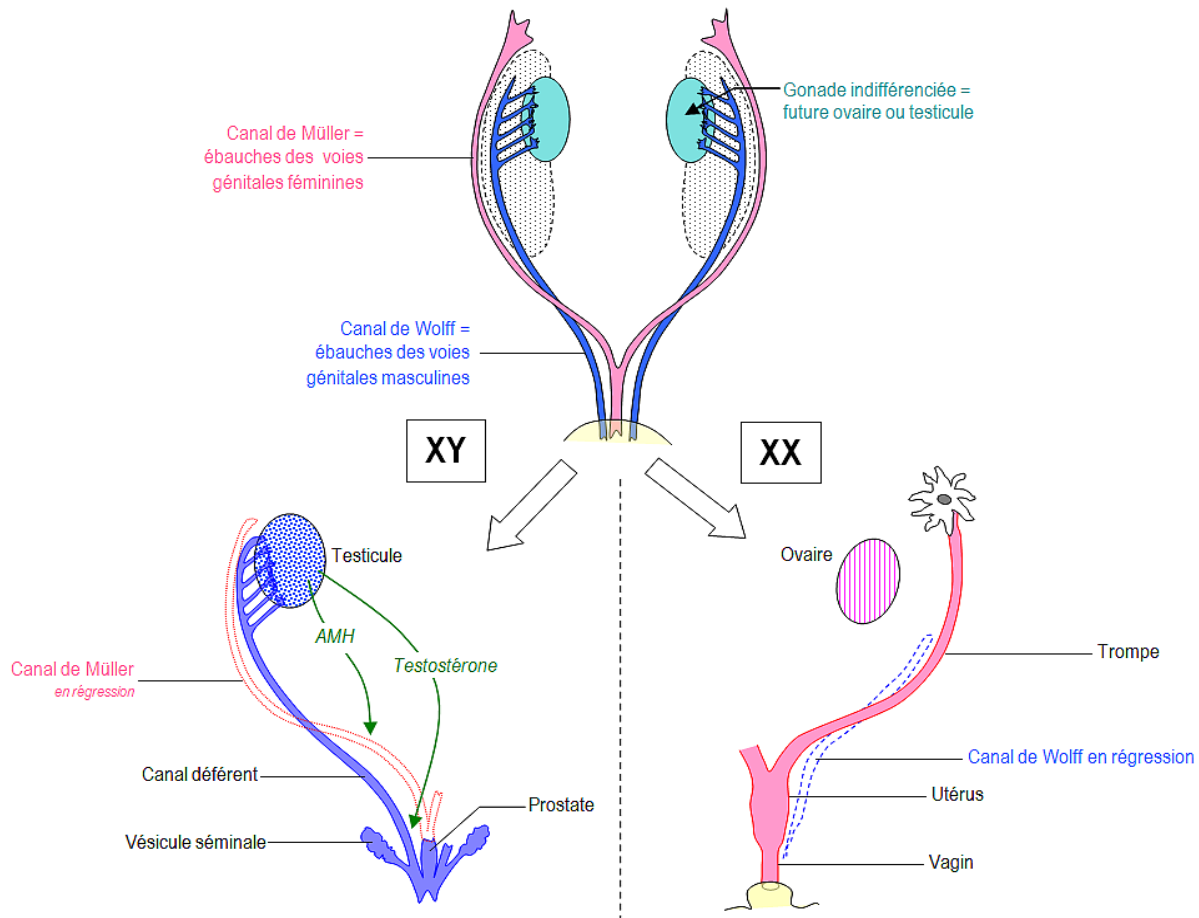


Figure 1: Différenciation des voies génitales internes

(Smiti., 2016).

Les tubules séminifères sont séparés par du mésenchyme, qui donne naissance aux cellules de Leydig. À la huitième semaine, ces cellules sécrètent de la testostérone. La production de cette hormone est stimulée par la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) atteignant son maximum entre la 8e et la 12^e semaine, ainsi la testostérone induit une différenciation masculine des canaux mésonephriques et des organes génitaux externes (**Rey et al., 2020**).

Le *rete testis* assurent la connexion de l'épididyme et des tubules séminifères, ces derniers restent immatures jusqu'à la puberté, où leurs lumières commencent à se développer, marquant le début de la spermatogenèse.

I.2. Anatomie de l'appareil génital masculin

Le système reproducteur masculin se compose d'organes internes, comme les testicules, les épидидymes, les canaux spermaticques et les glandes annexes, ainsi que d'organes externes, notamment le scrotum et le pénis (**Figure 2**).

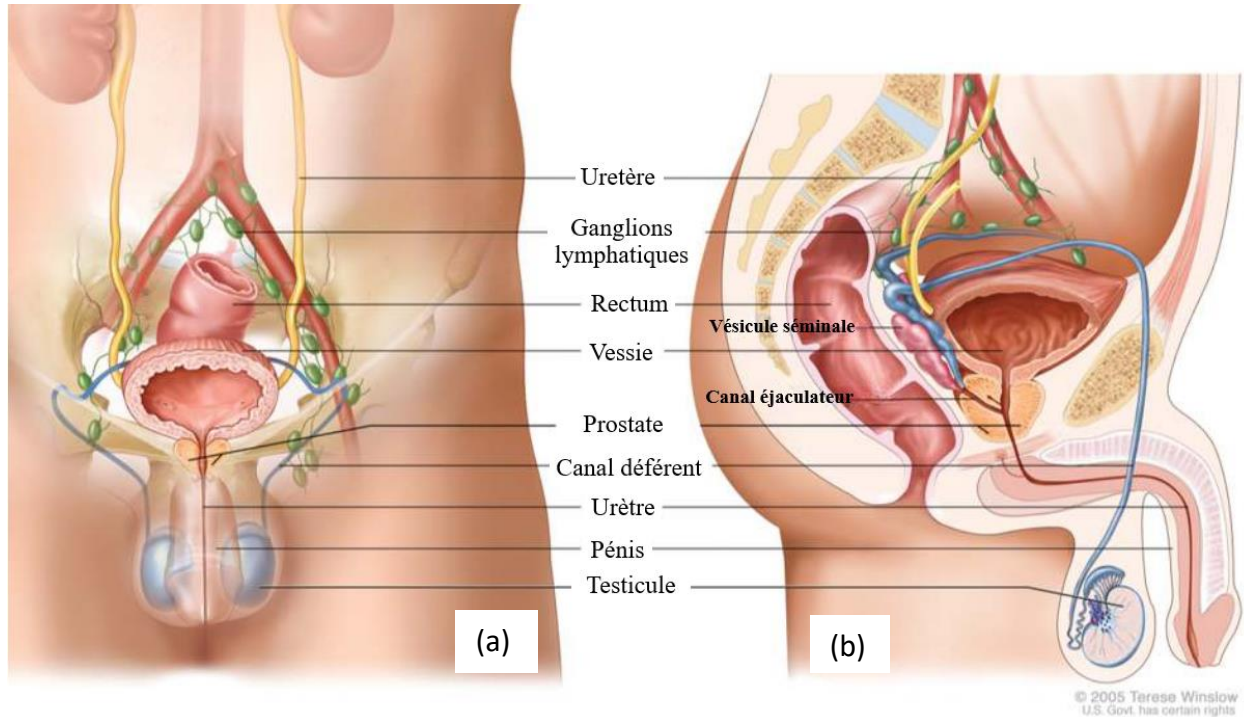


Figure 2: Schéma général de l'appareil génital masculin. (a) : vue frontale. (b) : coupe sagittale
(Scribner & Tadros, 2021).

I.2.1. Pénis

Le pénis est un organe clé dans la reproduction humaine, permettant la copulation et le dépôt des spermatozoïdes dans le vagin. Son anatomie est adaptée pour assurer une érection, une éjaculation et une transmission efficace des spermatozoïdes.

La position et la structure du pénis, en particulier le gland et le corps spongieux, facilitent le dépôt des spermatozoïdes près du col de l'utérus, augmentant les chances de fécondation (**Standring, 2020**).

I.2.2. Testicules

Les testicules sont des organes pairs de 4 à 5 cm de long pour 3cm de large pesant 20g. Ils possèdent deux fonctions complémentaires : la spermatogénèse, c'est la production des spermatozoïdes de façon constante et cela de la puberté jusqu'à la fin de leur vie, et la stéroïdogénèse qui correspond à la production et sécrétion des hormones stéroïdiennes.

Chaque testicule est situé dans le scrotum et entouré d'une enveloppe épaisse de tissu conjonctif appelée *tunica albuginea*, à partir de laquelle se forment des septas qui séparent le parenchyme en lobules (**Figure 3**). Chaque lobule contient plusieurs tubules (lieu de la spermatogenèse) entourés d'un tissu interstitiel. Les tubules séminifères de tous les lobules se rejoignent dans un réseau de canalicules appelés tubules droits, qui forment à leur tour le système collecteur appelé *rete testis* (ou réseau testiculaire), situé dans le *médiastinum testis*, de là partent les canaux efférents, qui rejoignent l'épididyme (**Standring, 2020 ; Tiwana & Leslie, 2023**).

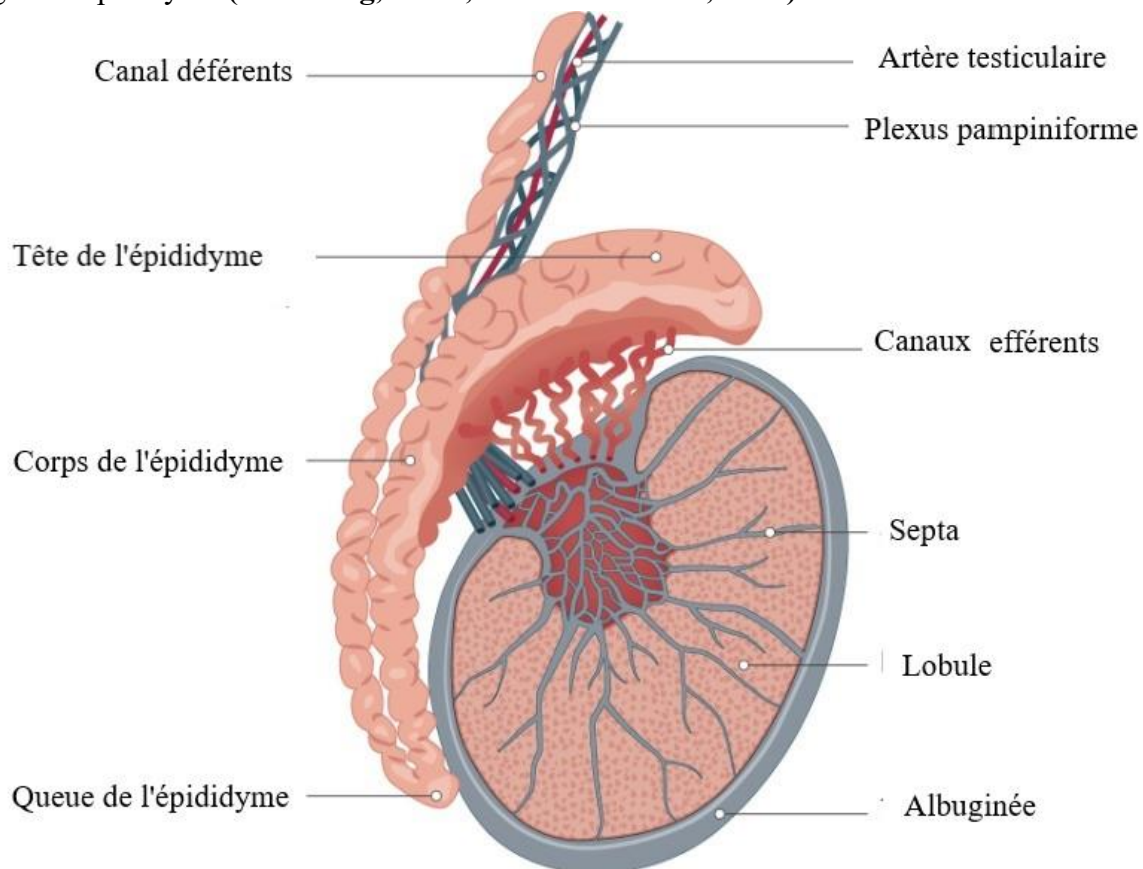


Figure 3: Anatomie du testicule.

(Tiwana & Leslie, 2023)

I.2.3. Voies génitales

a) Epididyme

L'épididyme humain est un tube enroulé situé sur la face postérieure du testicule, essentiel pour le transport, le stockage et la maturation des spermatozoïdes avant l'éjaculation. Il est divisé en trois régions : le caput (tête), le corpus (corps) et la cauda (queue).

Le caput, principalement composé de canaux efférents, reçoit les spermatozoïdes immatures provenant du testicule, tandis que le corpus et la cauda facilitent respectivement la maturation supplémentaire et le stockage. Les spermatozoïdes subissent des modifications biochimiques lors de leur transit à travers l'épididyme, acquérant ainsi leur motilité et leur capacité à féconder.

L'épididyme est tapissé d'un épithélium pseudostratifié contenant des cellules principales, basales, claires et étroites, qui contribuent à la sécrétion de fluides, à l'absorption et à l'acidification du milieu luminal (**Sullivan *et al.*, 2019**).

b) Canal défèrent

Depuis l'épididyme, le canal défèrent transporte les spermatozoïdes jusqu'au canal éjaculateur. Ce canal descend dans le bassin, où il fusionne avec les canaux des glandes séminales pour former le canal éjaculateur, qui pénètre dans l'urètre.

c) Urètre

L'urètre est un tube qui va de la vessie à l'extérieur du corps en passant par le pénis (**Bastawros *et al.*, 2023**).

I.2.4. Glandes annexes

a) Vésicules séminales

Les vésicules séminales, au nombre de deux, sont des glandes qui interviennent dans la production de liquide séminal, composant majoritaire du sperme. Les vésicules séminales sont reliées aux canaux déférents, qui transportent le sperme de l'épididyme vers l'urètre (**World Health Organization, 2021**).

b) Prostate

La prostate est une glande musculaire située sous la vessie et entourant l'urètre. Elle interagit avec les vésicules séminales et les glandes bulbo-urétrales pour produire un liquide séminal optimal.

Le liquide prostatique constitue environ 30 % du volume du sperme. Il contient des enzymes (PSA), des ions (zinc, calcium) et des métabolites essentiels à la survie et à la motilité des spermatozoïdes (**Vashisht *et al.*, 2024**).

c) Glandes bulbo-urétrales

Les glandes bulbo-urétrales sont des structures appariées situées dans le pelvis masculin, sous la prostate et de part et d'autre de l'urètre membraneux. Elles sont de petite taille et sont composées de tubules et de canaux excréteurs qui se drainent dans l'urètre spongieux (**Muro *et al.*, 2021**).

Elles jouent un rôle crucial dans la reproduction masculine en sécrétant un liquide pré-éjaculatoire.

I.3. Histologie du testicule

Le parenchyme testiculaire est morphologiquement divisé en deux compartiments interdépendants : le tissu interstitiel et les tubules séminifère.

I.3.1. Tissu interstitiel

Le tissu interstitiel contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que divers types de cellules, notamment les cellules de Leydig, qui produisent la testostérone, et les macrophages, ces derniers étant le type de cellule immunitaire le plus nombreux dans le testicule.

a) Cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont les cellules les plus abondantes dans l'interstitium. Leur fonction principale est de synthétiser et de sécréter des androgènes, nécessaires au déroulement de la spermatogenèse et au maintien de la fertilité masculine. Elles sont soit regroupées en amas près des vaisseaux sanguins, soit situées à proximité des tubules séminifères (**Aladamat & Tadi, 2021**).

Les cellules de Leydig possèdent un noyau unique qui présente un à trois nucléoles indicateurs d'une activité de transcriptionnelle, elles comportent les cristaux de Reinke qui sont des structures cristalloïdes dont le rôle n'est pas encore élucidé (**Planinić et al., 2022**). Elles produisent de la testostérone à partir du cholestérol fournit par la vascularisation.

I.3.2. Tubules séminifères

Les tubules séminifères sont entourés de cellules myoïdes péritubulaires. Ils contiennent les cellules de Sertoli polarisées, qui soutiennent les cellules germinales, depuis les cellules souches spermatogoniales localisées à la membrane basale du tubule, jusqu'aux spermatozoïdes situés vers la lumière du tubule. Leur fonction sécrétoire joue un rôle nourricier pour les cellules germinales en développement, tandis que leurs jonctions serrées constituent la partie physique de la barrière hémato-testiculaire (BHT), offrant un rôle protecteur contre les agressions systémiques (**Figure 4**).

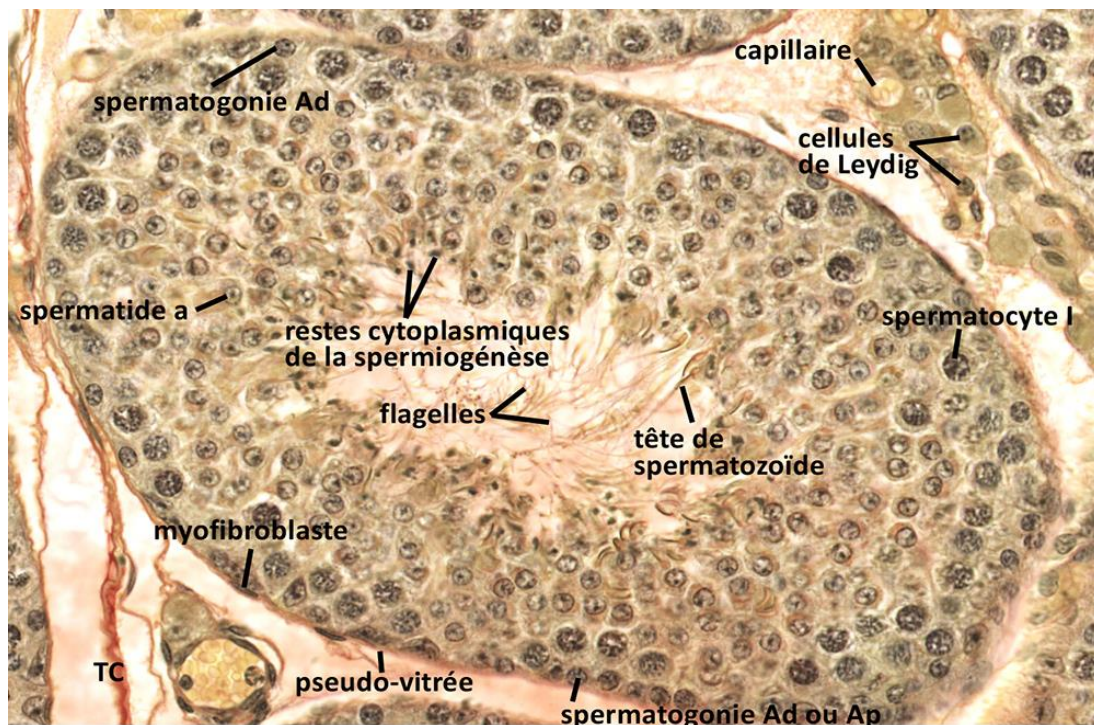


Figure 4: Coupe transversale de tube séminifère colorée par la méthode de Van Gieson au microscope optique. (Objectif X 40)

(Auteur anonyme)

a) Cellules myoïdes péricubulaires (PMC)

Chez l'humain, les cellules myoïdes péricubulaires (PMC) sont des cellules allongées ressemblant à des cellules musculaires lisses, délimitant physiquement les compartiments inter- et intratubulaires par 5 à 7 couches perméables. Les PMC produisent le facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire (PEDF / SERPINF1), une molécule anti-angiogénique qui empêche la vascularisation des tubules, essentielle pour le maintien de la barrière hémato-testiculaire et de la spermatogenèse.

La testostérone favorise également la contraction des PMC via les prostaglandines, permettant la migration des spermatozoïdes immobiles le long des tubules séminifères vers l'épididyme (**Mayerhofer, 2020**).

b) Cellules de Sertoli

La cellule de Sertoli est polarisée de la base de l'épithélium jusqu'à la lumière du tubule, elles sont donc en contact avec les cellules germinales tout le long de leur maturation. La cellule possède un noyau ovalaire, sa chromatine est fine et son nucléole proéminent bien visible, caractéristique d'une activité métabolique élevée.

Elles présentent une plasticité morphologique et sécrétrice qui crée un microenvironnement spécifique, fournissant des nutriments et des signaux paracrines. Cet environnement permet aux cellules germinales testiculaires de survivre, de se répliquer et de se différencier le long de l'épithélium séminifère (**Griswold, 2018**).

I.4. Spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus biologique hautement régulé qui implique la différenciation des cellules germinales primordiales en spermatozoïdes matures. Ce processus dure environ 74 jours dans l'épithélium séminifère humain. (**Figure 5**)

Chaque étape de la spermatogenèse a une durée constante et assure une formation continue mais non synchrone des spermatozoïdes, permettant de maintenir la fertilité masculine. Les spermatogonies de type Adark, situées sur la membrane basale des tubules séminifères, constituent un réservoir de cellules capables de repeupler l'épithélium séminifère en cas de stress cytotoxique ou d'apoptose des cellules germinales en différenciation, leur capacité d'auto-renouvellement est contrôlée par les cellules myoïdes péricubulaires (PMC) et le GDNF dérivé des cellules de Sertoli (**Shalet, 2009 ; Griswold, 2018**).

La spermatogenèse peut être divisée en trois phases :

I.3.1. Phase mitotique

La phase mitotique commence avec la première division des spermatogonies Adark en une spermatogonie Apale responsable de l'auto-renouvellement et une spermatogonie de type B, engagée dans la différenciation. Cette dernière se divise en deux spermatocytes primaires "préleptotènes", qui se détachent de la membrane basale, traversent la barrière hémato-testiculaire

(BHT) et entrent dans le compartiment adluminal de l'épithélium séminifère, englobés par les cellules de Sertoli.

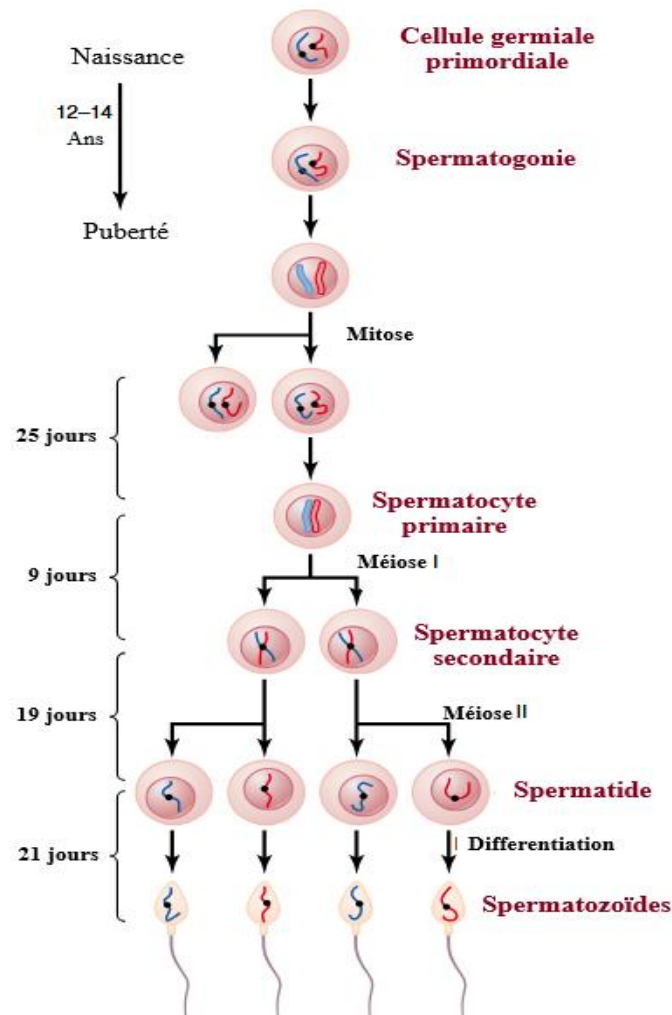


Figure 5: Etapes de la spermatogénèse

(Hall, 2020)

I.3.2.Phase méiotique : production de cellules haploïde

La phase méiotique se poursuit avec l'entrée en prophase I des spermatocytes primaires diploïdes, après la phase de réplication de l'ADN au stade préleptotène, la prophase I se subdivise en cinq stades différents: le stade leptotène (alignement axial des chromatides seules), le stade zygotène (appariement des chromosomes homologues), le stade pachytène (enjambement des chromatides et échange d'informations génétiques) et le stade diplotène (répulsion des chromosomes), jusqu'à la rupture de la membrane nucléaire lors de la diacinèse. La métaphase, l'anaphase et la télophase suivent rapidement pour former deux nouveaux spermatocytes secondaires haploïdes, qui subissent ensuite une deuxième division méiotique équationnelle produisant quatre spermatozoïdes ronds haploïdes à un seul chromatide (Ishiguro, 2024).

I.4.3.Phase de spermiogénèse

La spermiogenèse est la phase finale de la spermatogenèse, sans division cellulaire, les spermatides rondes se transforment en spermatozoïdes matures. Ce processus qui dure 23 jours, est caractérisé par des changements drastiques de la morphologie cellulaire (**Miyata *et al.*, 2024**) (**Figure 6**).

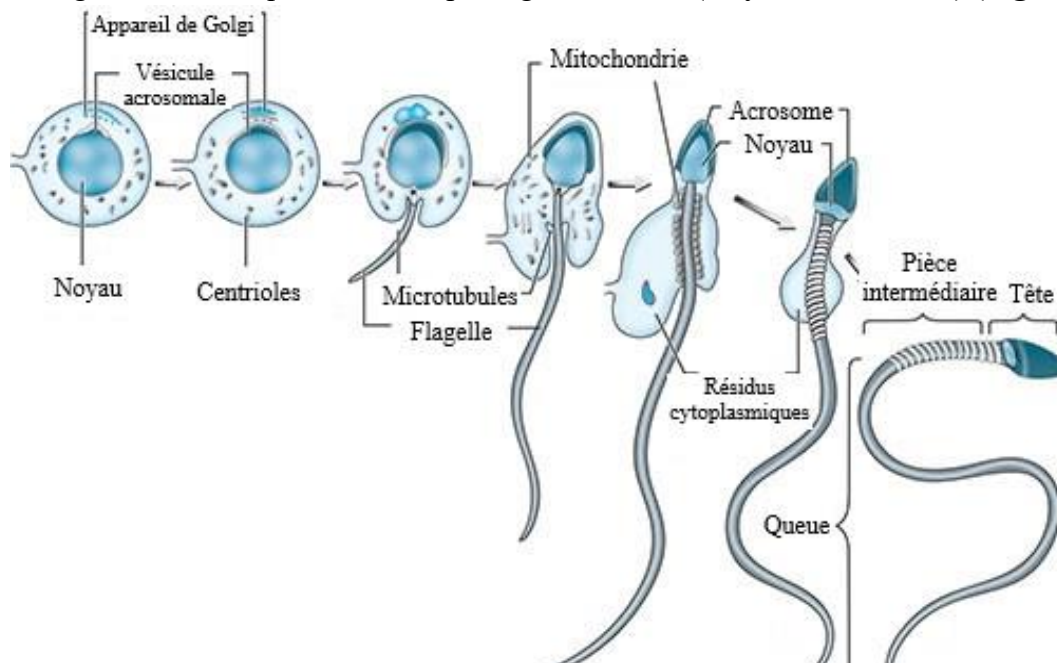


Figure 6: Modifications des organites intracellulaires des spermatozoïdes pendant la spermiogenèse

(**Chandra *et al.*, 2010**).

Les spermatides condensent leur chromatine pour former la tête des spermatozoïdes, ce qui entraîne l'arrêt de la transcription. Ils développent une queue à partir du centriole pour la mobilité ainsi qu'un acrosome formé à partir de l'appareil de Golgi pour la fusion cellulaire avec l'ovule, les mitochondries augmentent en nombre formant la partie centrale autour de la base de la queue. Enfin, ils éliminent la majeure partie de leur cytoplasme, qui deviendra des corps résiduels phagocytés par les cellules de Sertoli (**Umoh, 2024**).

La spermiation est le détachement des spermatozoïdes dans la lumière des tubules séminifères. Une fois que les spermatides allongées atteignent la lumière des tubules séminifères, une structure transitoire appelée le complexe tubulobulbaire se forme dans le cytoplasme de la cellule de Sertoli au contact de la spermatide. Ce complexe participe au remodelage de la membrane plasmique de la tête spermatique et permet l'internalisation des jonctions apicales établies entre la cellule de Sertoli et la spermatide. A la fin, l'excès cytoplasmique est phagocyté par la cellule de Sertoli et la spermatide se détache de l'épithélium séminifère et est libérée dans la lumière du tubule sous forme de spermatozoïde (**O'Donnell, 2015**).

Les spermatozoïdes sont ensuite propulsés le long des tubules séminifères jusqu'aux canaux éférents et à l'épididyme, où ils acquièrent leur motilité. Ce processus étant sujet à des erreurs, l'apoptose est une caractéristique commune de la spermatogenèse, les cellules germinales dégénératives sont également phagocytées par les cellules de Sertoli.

I.5. Régulation de la spermatogenèse

La régulation de la spermatogenèse est une procédure complexe qui engage des facteurs hormonaux, paracrines, autocrines et génétiques. Ce processus a lieu dans les tubules séminifères des testicules et est indispensable à la production de spermatozoïdes.

I.5.1. Régulation hormonale

La production des gamètes mâles est contrôlée par un système hormonal endocrinien impliquant plusieurs organes qui composent l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG) (**Figure 7**).

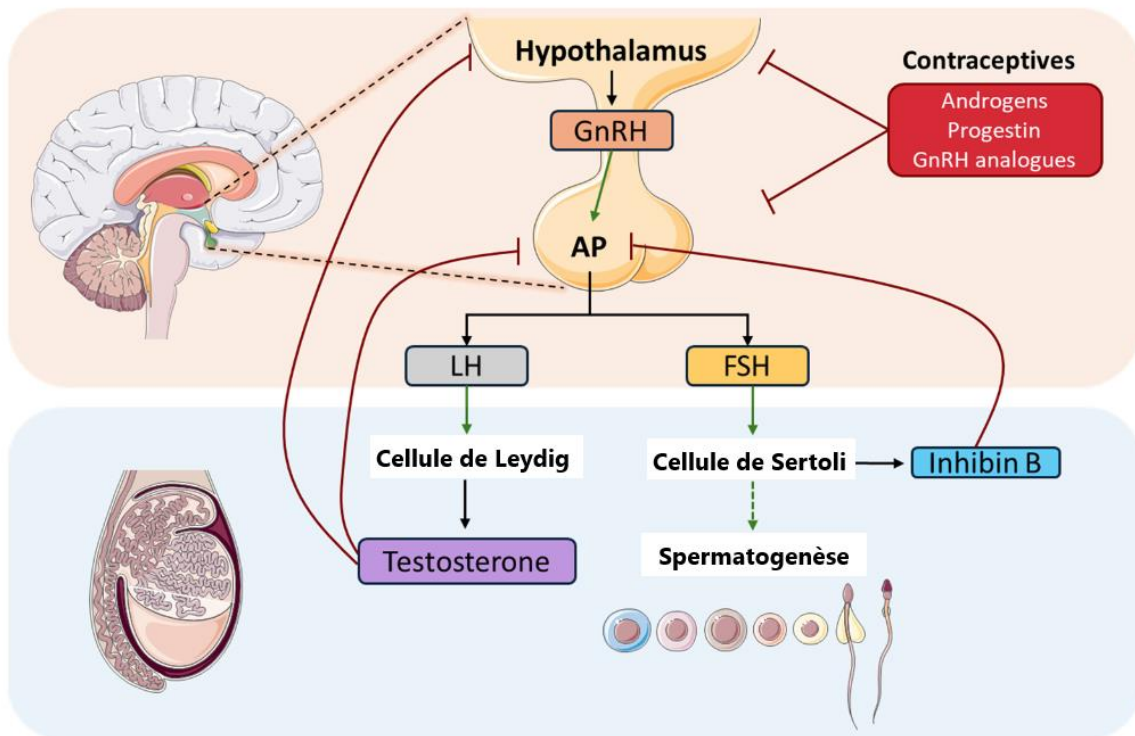


Figure 7: Représentation schématique du mécanisme endocrinien régulant le système reproducteur masculin

(Maroto *et al.*, 2025).

L'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) est produite et libérée de manière pulsatile par l'hypothalamus pour activer l'hypophyse antérieure. Ce dernier produit l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH), qui sont sécrétées dans la circulation. La LH active les cellules de Leydig pour initier la synthèse de la testostérone, alors que la FSH cible les cellules de Sertoli pour favoriser la maturation des cellules germinales (Li *et al.*, 2024).

La sécrétion de GnRH est maintenue à un niveau physiologique grâce à différents rétrocontrôles testiculaires. Un rétrocontrôle négatif est exercé par la testostérone, qui inhibe la sécrétion de LH, et par l'inhibine B sécrétée par les cellules de Sertoli, qui inhibe la production de FSH par l'hypophyse. Un rétrocontrôle positif est exercé par l'activine A sécrétée par les cellules de Sertoli, qui stimule la production de FSH par l'hypophyse (Bhattacharya *et al.*, 2023).

Les cellules interstitielles et intratubulaires orchestrent ainsi collectivement les fonctions testiculaires de gamétogenèse, de stéroïdogénèse et de privilège immunitaire, permettant le maintien de la fertilité masculine.

I.5.2.Régulation génétique

La spermatogenèse est sous le contrôle de mécanismes génétiques complexes qui garantissent une différenciation cellulaire précise et une expression génique spécifique à chaque stade grâce à trois niveaux de régulation différents : la régulation génique, la régulation transcriptionnelle et la régulation épigénétique (**Lui & Cheng, 2009**).

Les facteurs de transcription clés impliqués dans la régulation génétique de la spermatogenèse comprennent SRY (région Y déterminant le sexe) et SOX9 (facteur de transcription de la famille SRY-box 9), tous deux essentiels à la détermination du sexe et au développement des cellules germinales mâles. SRY, localisé dans la partie distale du bras court du chromosome Y, joue le rôle de régulateur principal en déclenchant la différenciation testiculaire par l'activation de Sox9 dans les cellules de Sertoli. Sox9, à son tour, stimule la transcription de gènes qui participent à la formation des tubules séminifères, comme l'AMH (hormone anti-müllérienne), et joue un rôle dans la régulation de l'environnement requis pour la spermatogenèse (**Maroto et al., 2025**).

I.5.3.Régulation thermique

Afin de garantir un déroulement optimal du processus spermatogénique, chez la plupart des mammifères, y compris l'homme, la température testiculaire doit être légèrement inférieure de quelques degrés (2-8°C) à la température centrale du corps. Effectivement, une température testiculaire de 37°C influence considérablement la quantité et la qualité des spermatozoïdes produits. Il est donc crucial de réguler la température testiculaire afin qu'elle reste à un niveau propice à la spermatogenèse. L'ajustement de ce paramètre est effectué par quelques structures anatomiques spécialisées et certaines propriétés histologiques associées (**Maroto et al., 2025**).

I.6. Structure du spermatozoïde

Les spermatozoïdes sont des petites cellules de 3µm de large et 60 µm de long. Ils sont composés de trois parties visibles en microscopie optique : une tête, une partie centrale et une région caudale distinctes (**Figure 8**).

a) Tête

La tête a pour rôle de transporter et de transmettre l'ADN paternel à l'ovocyte lors de la fécondation.

L'acrosome est une grande vacuole qui contient des glycoprotéines et plusieurs enzymes et forme une sorte de coiffe recouvrant 40 à 60 % de l'avant de la tête du spermatozoïde. Sa taille et sa forme dépendent de la forme de la tête et varient selon les espèces. Il est entouré d'une membrane acrosomique interne, en contact avec le noyau, et d'une membrane acrosomique externe, qui

fusionne avec la membrane plasmique. Son rôle principal est de libérer ses enzymes lors de la réaction acrosomique, un processus essentiel pour la fécondation (Stevens & Lowe, 2003).

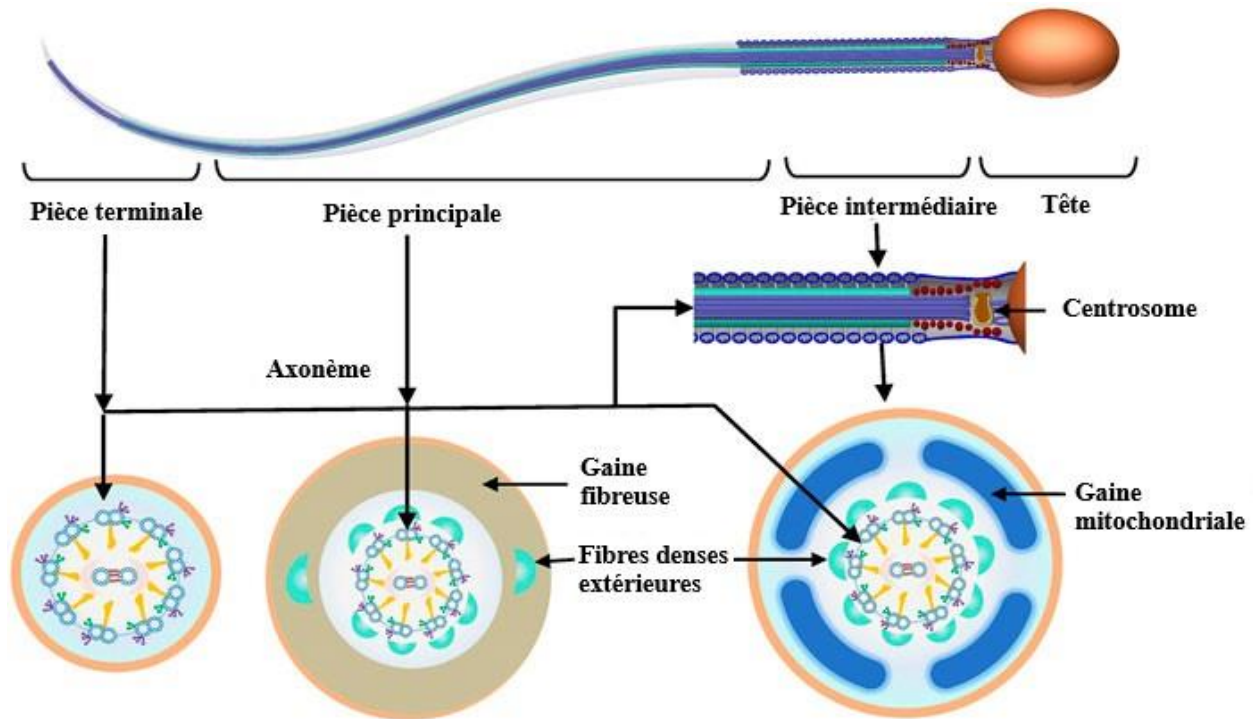


Figure 8: Structure d'un spermatozoïde normal

(Wang *et al.*, 2022)

b) Col ou l'appareil de jonction tête-flagelle

Comme son nom l'indique c'est la zone de jonction entre la tête et le flagelle, constitué d'un appareil centriolaire et d'une pièce connective. Le centriole proximal se situe dans la fosse d'implantation, et joue un rôle important dans le développement précoce de l'embryon, en agissant comme un deuxième centriole dans le zygote (Alberts *et al.*, 2002).

La pièce connective émet neuf fibres denses entourant l'axonème. Chaque fibre dense est reliée à un doublet de microtubule permettant le maintien de la structure globale du flagelle. Elles ont également un rôle dans la motilité du flagelle puisque des mutations de gènes codant pour des protéines des fibres denses sont impliqués dans certains cas d'asthénozoospermie (Miyata *et al.*, 2024).

c) Flagelle

Le flagelle est constitué de trois parties, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale (Lehti & Sironen, 2017).

La pièce intermédiaire est constituée d'un manchon mitochondrial, à l'extérieur de neuf fibres denses entourant l'axonème. La pièce principale est constituée d'une gaine fibreuse et de colonnes longitudinales à l'extérieur des neuf fibres denses entourant l'axonème, en revanche, la pièce terminale du flagelle ne contient aucune structure péri-axonémale (Miyata *et al.*, 2024).

Le long de la queue du spermatozoïde se trouve l'axonème à l'intérieur, c'est l'unité centrale du flagelle ce dernier est composé de neuf doublets périphériques et de deux microtubules centraux.

I.7. Physiopathologie de la fertilité masculine

L'infertilité est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme l'incapacité de concevoir après 1 an de rapports sexuels réguliers non protégés. L'infertilité touche plus de 180 millions de personnes dans le monde, le facteur masculin étant responsable d'environ 10 % de l'infertilité des couples et de 50 % de l'infertilité en général (Esteves *et al.*, 2021).

On parle d'infertilité masculine primaire lorsque l'homme est incapable de concevoir un enfant, malgré des rapports sexuels régulière et non protégés pendant une durée minimale d'un an, sans qu'une grossesse n'ait été obtenu auparavant. En revanche l'infertilité masculine secondaire fait référence à une situation où l'homme ayant précédemment réussi à procréer, se retrouve dans l'incapacité à concevoir (Leslie *et al.*,2024).

I.7.1. Anomalies spermatiques

Tableau 1: Synthèse des différentes anomalies spermatiques au spermogramme-spermocytogramme selon les seuils de l'OMS 2021 (WHO, 2021).

Anomalies	Définition	OMS 2021
Hypospermie	Diminution du volume de l'éjaculat (en mL)	< 1,4mL
Hyperspermie	Augmentation du volume de l'éjaculat (en mL)	< 6 mL
Oligospermie	Diminution du nombre de spermatozoïdes (en M par mL)	< 16M/mL
	Diminution du nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat	< 39 M
Nécrospermie	Diminution du pourcentage de formes vivantes	< 54%
Asthénospermie	Diminution du pourcentage de formes mobiles a+b	< 30%
	Diminution du pourcentage de formes mobiles a+b+c	< 42%
	Augmentation du pourcentage de formes immobiles d	> 20%
Tératospermie	Diminution du pourcentage de formes normales selon Kruger	< 4%
Leucospermie	Augmentation de la concentration de Leucocytes dans l'éjaculat.	≥ 1 M/mL

I.7.2. Etiologies de l'infertilité masculine

- **Causes pré -testiculaires**

Les causes pré-testiculaires comprennent les anomalies de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

Hypogonadisme hypogonadotrope (HH)

C'est une condition qui se caractérise par une diminution de la sécrétion de gonadotrophines due à un dysfonctionnement de l'hypothalamus ou de l'hypophyse. L'hypogonadisme hypogonadotrope a des causes congénitales et acquises.

L'hypogonadisme hypogonadotrope congénital peut être idiopathique ou dû à des syndromes génétiques (syndrome de Kallmann, syndrome de Prader-Willi). L'hypogonadisme hypogonadotrope acquis peut être causé par des lésions hypophysaires (tumeur, granulome, abcès) ou des blessures (irradiation, traumatisme, chirurgie), la prise de drogues illicites (stéroïdes anabolisants, opiacés), l'abus d'alcool et la surcharge en fer (**Franco et al., 2023**).

- **Causes testiculaires**

Les troubles intrinsèques de la spermatogenèse sont dus à des mutations génétiques, aux effets gonadotoxiques de médicaments, à des testicules non descendus, à des dommages testiculaires provoqués par une varicocèle, à une torsion testiculaire, à une orchite et à des causes idiopathiques.

- **Causes post-testiculaires**

Les spermatozoïdes libérés dans la lumière des tubes séminifères convergent vers le rete testis au niveau du hile testiculaire. Ils se dirigent ensuite, via les canaux efférents, vers la tête de l'épididyme où ils confluent vers le canal épидидymaire qui traverse le corps de l'épididyme pour ensuite donner naissance au canal déférent au niveau de la queue de l'épididyme.

Lors de l'éjaculation, l'ensemble du liquide séminal, comprenant les spermatozoïdes et les sécrétions des vésicules séminales et prostatiques est conduit vers l'urètre prostatique par les canaux éjaculateurs. La fermeture concomitante du sphincter vésical associé à un péristaltisme des muscles lisses assure l'expulsion du liquide séminal vers l'urètre pénien puis à travers l'orifice du méat urétral. Tout ce cheminement peut être le siège d'obstacles. Parmi les obstacles post-testiculaires, il faut citer les ligatures volontaires des déférents pratiquées lors des vasectomies et les ligatures involontaires des déférents lors de chirurgies pour hernie inguinale.

Enfin tout processus infectieux des voies excrétrices peut entraîner des lésions suivies de séquelles à type obstacle même si leur prévalence est discutée dans la littérature. Elles concerneraient particulièrement les canaux éjaculateurs situés au niveau prostatique (**Young, 2016**).

I.8. Exploration fonctionnelle de l'infertilité

L'analyse du sperme est une méthode de base pour évaluer la qualité du sperme et rechercher la cause de l'infertilité chez l'homme. L'OMS a élaboré six versions d'un guide dédié aux méthodes d'évaluation du sperme. Le premier manuel, fondé sur l'expérience clinique et la recherche, a été publié en 1980, suivie des versions publiées en 1987, 1992, 1999, 2010 et 2021 (**WHO, 2021**).

L'aspect idéal ou typique des spermatozoïdes est décrit comme étant lisse et ovale avec un contour régulier d'une région acrosomique bien définie occupant 40 à 70 % de la surface de la tête du

spermatozoïde. Dans la zone acrosomique, il ne doit pas y avoir de vacuoles géantes mais seulement deux vacuoles minuscules ou moins, n'excédant pas un cinquième de la tête du spermatozoïde. En revanche, il ne devrait pas y avoir de vacuoles dans la région post-acrosomique (WHO, 2021).

Bien que l'analyse du sperme permette de déterminer les anomalies du sperme telles que l'asthénozoospermie, l'oligozoospermie et l'azoospermie, ce test ne permet pas de déterminer avec certitude la fertilité ou l'infertilité chez tous les patients (Oehninger & Ombelet, 2019).

I.8.1.Évaluation de l'échantillon de sperme

Dans la sixième édition du manuel de laboratoire de l'OMS pour l'examen du sperme humain, la procédure est divisée en trois parties. La première partie est un examen de base du sperme. L'évaluation de base comprend la mesure du volume de l'éjaculat, l'évaluation macroscopique et l'examen microscopique (WHO, 2021 ; Björndahl *et al.*, 2022).

Plusieurs outils permettent d'évaluer la qualité du sperme et de trouver des traitements adaptés à chaque couple infertile. Chaque paramètre du sperme reflète une cause spécifique qui doit être clarifiée.

I.8.1.1. Évaluation macroscopique du sperme

L'évaluation macroscopique fait référence aux paramètres chimiques et physiques de l'éjaculat, notamment la fluidification, la viscosité, l'apparence, l'odeur, le volume et le pH.

a) Liquéfaction, viscosité et apparence

La liquéfaction du sperme dure de 15 à 30 minutes et est régulé par la sécrétion prostatique, qui est riche en acide citrique agissant en synergie avec des enzymes protéolytiques (lysozyme, α -amylase et β -glucuronidase) et l'antigène spécifique prostatique (PSA), une protéase semblable à la trypsine, qui clive les protéines de la seménogéline.

La viscosité est la caractéristique d'un échantillon d'éjaculat à présenter une homogénéité visqueuse, qui peut être réduite ou augmentée en raison de diverses conditions. Un échantillon normalement liquéfié aura un aspect opalescent, de couleur crème/grise (Krausz *et al.*, 2023).

b) Volume et pH

Le plasma séminal est composé principalement des sécrétions des glandes accessoires (environ 90 %), tandis que la contribution de l'épididyme et des glandes bulbo-urétrales est minime. Le volume de sperme exprime l'activité sécrétoire de ces glandes.

La prostate et les vésicules séminales contribuent toutes deux au pH du sperme, la prostate produit un liquide acide, tandis que les vésicules séminales produisent un liquide alcalin, ce qui conduit à un pH neutre typique, autour de 7,2-7,4.

c) Odeur

Il y'a une grande diversité dans la capacité des personnes à percevoir l'odeur normale d'un éjaculat humain. La présence d'une forte odeur d'urine ou de putréfaction peut avoir une signification clinique ; il est donc important de l'indiquer dans le rapport.

I.8.1.2. Évaluation microscopique du sperme

L'évaluation microscopique fait référence à la fraction cellulaire du sperme et comprend l'agglutination, l'agrégation, la concentration des spermatozoïdes, la mobilité, la vitalité, la morphologie et les cellules rondes (**Krausz et al., 2023**).

a) Concentration de spermatozoïdes

La concentration représente le nombre de spermatozoïdes, exprimé en millions, contenu dans un millilitre (nbre x 10^6 /ml) d'éjaculat. Le terme « valeur absolue » fait référence au nombre de spermatozoïdes présents dans l'échantillon total, et se détermine en effectuant la multiplication de la concentration de spermatozoïdes par le volume de l'éjaculat. On les considère toutes deux comme de bons indicateurs des probabilités de conception. Cependant, la valeur absolue est un indicateur plus fiable de la fonction testiculaire, car contrairement à la concentration, elle n'est pas influencée par le volume des sécrétions générées par les glandes accessoires (**WHO, 2010**).

b) Motilité

Il est recommandé d'utiliser un système de classification en quatre catégories. Les données cliniques issues de l'évaluation manuelle de la mobilité des spermatozoïdes et de l'analyse des spermatozoïdes assistée par ordinateur montrent que l'identification des spermatozoïdes à progression rapide est importante.

- Rapidement progressif ($\geq 25 \mu\text{m/s}$) : spermatozoïdes se déplaçant activement, soit de façon linéaire, soit en formant un grand cercle, couvrant une distance, du point de départ au point d'arrivée,
- Lentement progressif ($5 \text{ to } < 25 \mu\text{m/s}$) : les spermatozoïdes se déplacent activement, soit de façon linéaire, soit dans un grand cercle, couvrant une certaine distance, du point de départ au point d'arrivée,
- Non progressif ($< 5 \mu\text{m/s}$) : tous les autres modèles de mouvements actifs du flagelle avec une absence de progression - c'est-à-dire nager en petits cercles, la force flagellaire déplaçant la tête de moins de $5 \mu\text{m}$ (une longueur de tête), du point de départ au point d'arrivée ;
- Immobile - absence de mouvements actifs du flagelle (**WHO, 2021**).

c) Morphologie des spermatozoïdes

La morphologie des spermatozoïdes est un indicateur important de la fertilité masculine. Selon la 6^e édition de l'OMS, la tératozoospermie est la nomenclature qui signifie que la morphologie des spermatozoïdes est inférieure à la valeur de référence selon les critères stricts de Kruger (**Figure 9**).

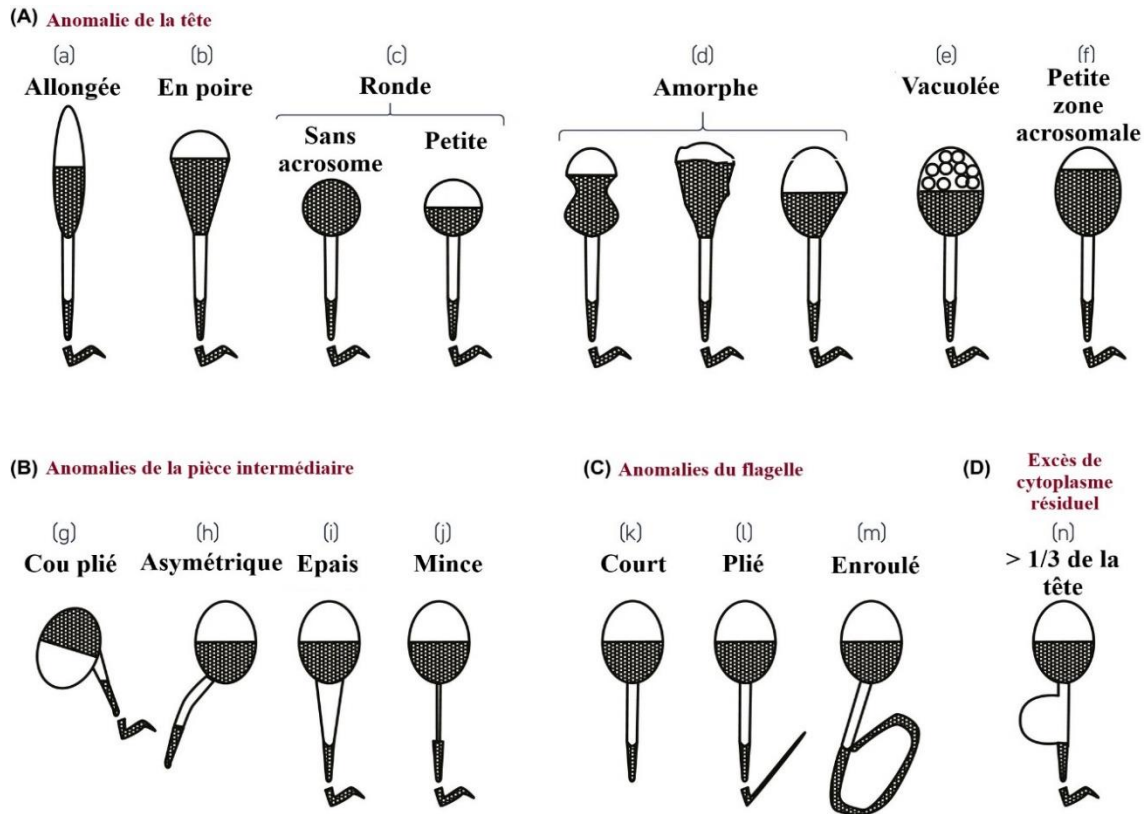


Figure 9 : Exemples d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes

(World Health Organization, 2021)

Outre la classification utilisée par l'OMS, il existe d'autres systèmes de classifications de la morphologie des spermatozoïdes. Cependant, elles ne sont pas acceptées au niveau mondial mais sont utilisées dans certains pays (**Blanchard et al., 2011**).

Parmi ces systèmes, la classification de David modifiée qui classe les anomalies morphologiques des spermatozoïdes en trois catégories :

Sept anomalies de la tête : allongée, amincie, microcéphales, macrocéphale, multiple, anomalie de la région acrosomique, anomalies de la base.

Trois anomalies de la pièce intermédiaire : reste cytoplasmique, pièce intermédiaire grêle, pièce intermédiaire angulée

Cinq anomalies de la pièce principale c'est à dire du flagelle : absent, écourté, de calibre irrégulier, enroulé et multiple (**Aktas et al., 2024**).

a) Vitalité des spermatozoïdes

La vitalité des spermatozoïdes, estimée en évaluant l'intégrité membranaire, peut être déterminée systématiquement sur tous les éjaculats, mais n'est pas nécessaire lorsqu'au moins 40 % des spermatozoïdes sont mobiles.

Le taux de spermatozoïdes vivants est déterminé en identifiant ceux dont la membrane cellulaire est intacte, par exclusion de colorant (les cellules inertes ont des membranes plasmiques endommagées qui permettent l'entrée de colorants imperméables à la membrane) ou par gonflement hypotonique. Le test préconisé pour le diagnostic est le test éosine-nigrosine. Le test doit être estimé dès que possible après la liquéfaction de l'échantillon de sperme, de préférence 30 minutes après l'éjaculation, pour limiter les effets délétères de la déshydratation ou des changements de température sur la vitalité (WHO, 2021).

1.8.1.3. Spermoculture

La spermoculture est recommandée dans le contexte des techniques de procréation médicalement assistée, où la compréhension de l'écologie microbienne de l'appareil reproducteur masculin peut éclairer les décisions cliniques. Cette technique consiste à cultiver des spermatozoïdes dans le but d'évaluer la présence de micro-organismes et leur impact potentiel sur la fertilité masculine (Virecoulon *et al.*, 2001).

D'après l'étude menée par **Puerta Suárez *et al.* (2015)**, la présence de bactéries dans le sperme n'est pas forcément liée à une baisse de la qualité du sperme, ce qui suggère que la présence de microbes n'est pas toujours néfaste.

I.9. TECHNIQUES DE PMA

Les techniques de procréation assistée ont révolutionné le domaine du traitement de la fertilité, offrant de l'espoir aux personnes et aux couples confrontés à l'infertilité. Elles sont complexes, très réglementées et nécessitent l'expertise de spécialistes de la fertilité pour garantir des résultats sûrs et fructueux. Cependant, le coût de ces techniques est très élevé et peut varier considérablement en fonction des procédures spécifiques, de la situation géographique et des circonstances individuelles (Bastawros *et al.*, 2023).

L'utilisation de sperme présentant des niveaux d'IFD plus faibles dans les cycles d'ICSI a entraîné des taux de grossesse clinique plus élevés, des taux de fausses couches plus faibles et des taux de naissances vivantes plus élevés par rapport au sperme à IFD élevé ; par conséquent, la sélection de sperme à IFD faible permet d'obtenir de meilleurs résultats en matière de techniques de procréation médicalement assistée (PMA) (Esteves *et al.*, 2015).

Un taux élevé de SDF est préjudiciable au potentiel reproductif masculin, étant associé à l'infertilité, aux pertes de grossesse récurrentes et à l'échec des techniques de procréation médicalement assistée (Li *et al.*, 2021).

I.9.1. Techniques de procréation médicalement assistée

L'assistance médicale à la procréation comprend tous les traitements ou procédures qui incluent la manipulation in vitro d'ovocytes et de spermatozoïdes humains ou d'embryons, dans le but d'établir une grossesse. Les techniques sont généralement divisées en trois grandes catégories :

Techniques de premier niveau : les plus simples et les moins invasives, telles que l'insémination intra-utérine (IUI) avec ou sans stimulation ovarienne.

a) Insémination intra-utérine (IUI)

L'insémination intra-utérine (IUI) est une technique où on va déposer après stimulation ovarienne, des quantités importantes de spermatozoïdes à l'entrée du col de l'utérus ou dans l'utérus traversant le col pour améliorer les chances de conception.

Les techniques de deuxième niveau sont plus complexes et plus invasives et peuvent être réalisées sous anesthésie locale ou sédation profonde. Elles diffèrent des techniques de base car elles impliquent la manipulation des gamètes féminins et masculins et nécessitent une fécondation in vitro (**Maria Matteo., 2022**).

b) Fécondation in vitro (FIV)

La FIV consiste à placer les spermatozoïdes à proximité de l'ovocyte et à laisser l'un d'entre eux le féconder naturellement. Cette technique peut être utilisée lorsque le sperme possède le nombre adéquat de spermatozoïdes avec une mobilité suffisante pour féconder l'ovule.

c) Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI)

La fécondation in vitro avec injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) est une technique de procréation assistée qui permet d'inséminer un ovocyte par micro-injection d'un seul spermatozoïde. L'ICSI nécessite la sélection d'un spermatozoïde qui sera injecté dans l'ovocyte, forçant ainsi sa fécondation.

d) Test génétique préimplantatoire (PGT)

Le PGT consiste à tester les embryons pour détecter des anomalies génétiques avant leur transfert utérin. Il peut contribuer à réduire le risque de transmission de certaines maladies génétiques

I.9.2. Techniques de sélection des spermatozoïdes

Les techniques conventionnelles et avancées de sélection des spermatozoïdes ont modifié progressivement la procréation assistée en améliorant les résultats et en apportant des solutions aux facteurs d'infertilité masculine. Les méthodes efficaces de sélection des spermatozoïdes visent à isoler les spermatozoïdes présentant la meilleure mobilité, la meilleure morphologie et la meilleure intégrité génétique, améliorant les taux de réussite de la fécondation et la qualité embryonnaire.

Ces techniques vont du swim-up conventionnel, de la centrifugation en gradient de densité (DGC), de la sélection de la barrière COC et des tests HOS à des techniques plus avancées. Même si les méthodes traditionnelles sont fréquemment utilisées, elles présentent des limites dans la détection des lésions de l'ADN et du stress oxydatif. Pour remédier à ces lacunes, des techniques plus récentes comme le tri cellulaire activé par magnétisme (MACS), la microfluidique et d'autres

méthodes ont été mises au point pour sélectionner des spermatozoïdes présentant une meilleure intégrité génétique (**Dai et al., 2021**).

a) Technique Swim-Up

Le Swim-up est la méthode de sélection des spermatozoïdes la plus ancienne, et l'une des plus rentables ; elle est largement utilisée en raison de la simplicité de l'approche et de son efficacité à sélectionner les spermatozoïdes mobiles. Cette technique consiste à déposer un milieu de culture sur le sperme liquéfié. Les spermatozoïdes mobiles nagent alors dans le milieu ; ainsi, ces derniers remontent dans le milieu, laissant derrière eux les cellules immobiles ou moins viables (**Esteves et al., 2011**).

b) Density Gradient Centrifugation (DGC)

L'échantillon de sperme est pipeté sur la colonne de densité, puis centrifugé. La centrifugation en gradient de densité sépare les spermatozoïdes selon leur densité. De cette façon, il est possible de sélectionner les spermatozoïdes mobiles et morphologiquement normaux dans la solution avec la plus forte concentration de gradient, qui est aspirée pour une utilisation ultérieure.

c) Tri de cellules activé par magnétisme (MACS)

Le tri cellulaire activé par magnétisme (MACS) est la technique la plus récente et la plus sophistiquée pour le tri des spermatozoïdes dans le cadre de la procréation médicalement assistée. Cette technologie utilise des microbilles magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques pour isoler les cellules cibles en fonctions de leurs marqueurs de surface. Dans le cas de la sélection des spermatozoïdes, l'Annexin-V, une protéine de liaison aux phospholipides se lie à la phosphatidylsérine (PS) externalisée vers le feuillet externe de la membrane plasmique des spermatozoïdes apoptotiques (**Ahmadi et al., 2022 ; Zhang et al., 2024**).

d) Tri microfluidique des spermatozoïdes

Le tri microfluidique des spermatozoïdes est une technologie émergente qui sélectionne les spermatozoïdes en reconstituant les mécanismes naturels de sélection par des canaux microfluidiques, laissant passer les spermatozoïdes les plus mobiles tout en les soumettant à un stress mécanique et oxydatif minimal (**Bhat et al., 2024**).

Les dispositifs sont composés de microcanaux dont les dimensions particulières correspondent à la taille des spermatozoïdes. L'établissement de conditions d'écoulement dans les microcanaux facilite la distinction et la récupération des spermatozoïdes mobiles et morphologiquement normaux, alors que les spermatozoïdes immobiles et les débris sont éliminés par une sortie distincte (**Zhang et al., 2024**).

e) Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes morphologiquement sélectionnés (IMSI)

C'est une technique pionnière en matière de procréation assistée, dont l'objectif premier est d'optimiser la sélection de spermatozoïdes de haute qualité en vue de la fécondation, en utilisant un microscope à fort grossissement, généralement de l'ordre de 6 000 fois, pour évaluer méticuleusement la morphologie des spermatozoïdes. L'IMSI vise à détecter les spermatozoïdes

possédant les caractéristiques structurelles et génétiques idéales, en évaluant des paramètres tels que les vacuoles nucléaires, l'intégrité acrosomique et les caractéristiques générales de la structure (**Zhang et al., 2024**).

En tirant parti d'un grossissement plus puissant, même les anomalies les plus infimes deviennent des anomalies identifiables qui pourraient passer inaperçues à des grossissements inférieurs. Le processus de sélection de l'IMSI pourrait réduire la probabilité de transmission d'anomalies génétiques ou de lésions de l'ADN à l'embryon en développement, améliorant les taux de grossesse (**De Vos et al., 2013**).

I.9.3. Cryoconservation du sperme

La cryoconservation du sperme permet aux hommes de conserver leur sperme en vue d'une utilisation future. Cette méthode est indiquée chez les hommes atteints d'un cancer et devant subir des traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie ou les hommes en bonne santé qui doivent conserver leur sperme à des fins futures avant une vasectomie ou après une procréation assistée. Cependant, le processus de congélation et de décongélation du sperme peut altérer sa qualité. Il a un impact sur la mobilité, la viabilité et la morphologie normale des spermatozoïdes, et augmente le stress osmotique entraînant des lésions de l'ADN spermatique (**Le et al., 2019**).

I.10. Structure de l'ADN spermatique et mécanismes de fragmentation

L'ADN des spermatozoïdes diffère considérablement de l'ADN des cellules somatiques en ce qui concerne son organisation, son conditionnement et sa stabilité. En raison des exigences uniques des spermatozoïdes, telles que la nécessité d'une forte compaction pour faciliter la motilité et protéger le matériel génétique, la chromatine des spermatozoïdes subit des modifications structurelles substantielles.

I.10.1. Structure de l'ADN spermatique

Dans les cellules somatiques, l'ADN est emballé dans la chromatine par des histones, formant des nucléosomes organisés en un filament solénoïde de 30 nm, qui régulent l'expression des gènes et l'accès au code génétique (**Figure 10**).

Dans les spermatozoïdes, ce conditionnement subit une transformation majeure : la majorité des histones sont remplacées par des protamines, des protéines hautement basiques qui permettent un compactage beaucoup plus serré de l'ADN. Il en résulte une organisation quasi cristalline, qui rend l'ADN des spermatozoïdes jusqu'à six fois plus condensé que celui des cellules somatiques (**Balder et al., 2024**).

I.10.2. Hypercompaction de la chromatine

La spermiogénèse permet la modification du noyau par condensation de la chromatine dû au remplacement des histones (H2A, H2B, H3, H4), par des protamines (PRM1 et PRM2).

Au stade de la spermatide ronde, les histones, dans un premier temps sont remplacées par des protéines de transition (TNP1 et TNP2 : Transition Nuclear Protein), lors du stade de l'élongation des spermatoïdes, les protéines transitoires sont à leur tour remplacées par des protamines de type 1 et des protamines de type 2, qui sont riches en arginine et en cystéine. Les petits résidus de cystéine sont capables de former des ponts disulfures entre les protamines, offrant ainsi une puissante stabilisation de la chromatine. De plus, les groupes arginine des protamines neutralisent les charges négatives de l'ADN, permettant le changement structural de la chromatine des spermatozoïdes, d'où un compactage nettement plus important (**Oliva, 2006 ; Kandil & Henkel, 2025**). Chez l'homme, il reste environ 15% des histones de départ et plus de 70% des protéines nucléaires basiques sont des protamines.

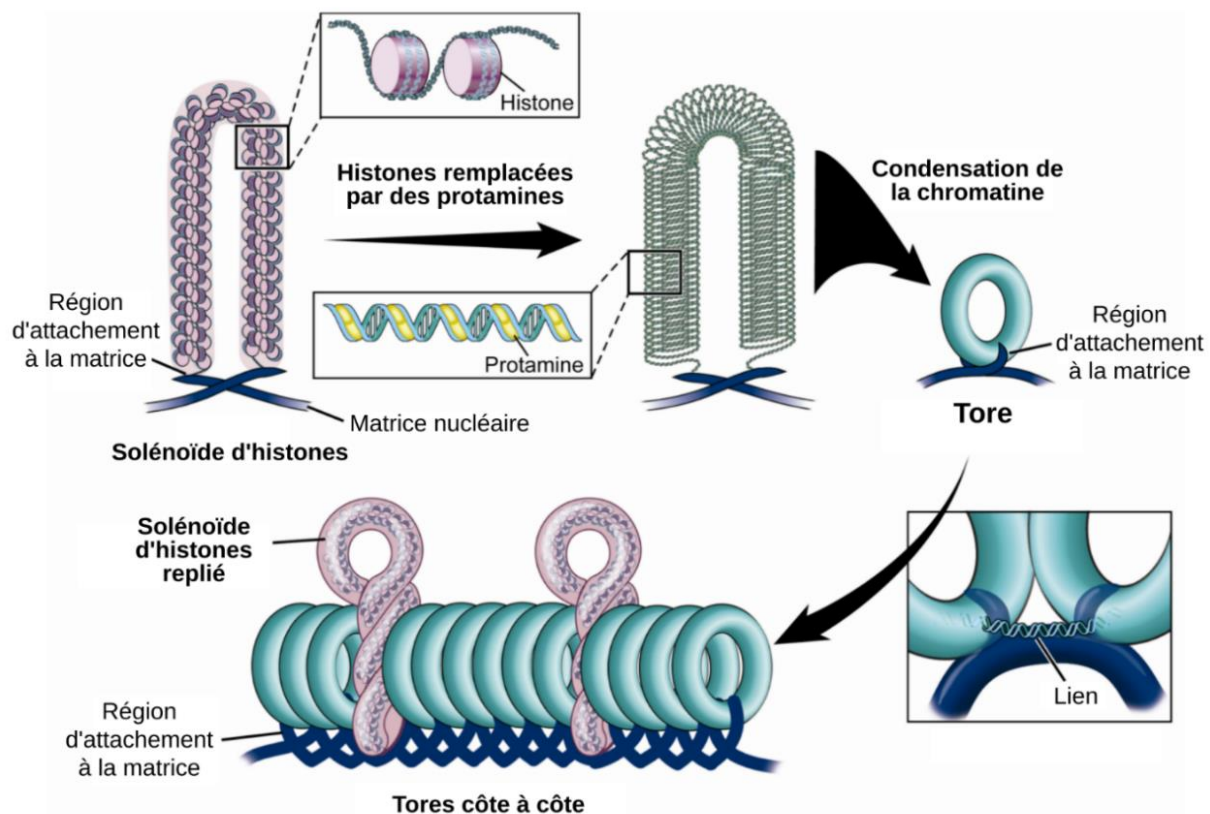


Figure 10: Organisation de l'ADN dans les spermatozoïdes de mammifères

(Singh & Agarwal, 2011)

Ce compactage serré est essentiel pour plusieurs raisons :

- Protection contre les dommages : L'ADN spermatique doit résister aux agressions environnementales, telles que les dommages oxydatifs et la fragmentation de l'ADN. Le compactage induit par la protamine réduit la susceptibilité aux ruptures et aux mutations
- Motilité accrue : l'ADN hautement condensé permet à la tête du spermatozoïde d'être plus hydrodynamique, ce qui facilite son déplacement dans l'appareil reproducteur féminin.

- Régulation épigénétique : Malgré la condensation extrême, une petite fraction des histones est conservée, en particulier dans les régions riches en gènes et importantes pour le développement. Ces histones contribuent à l'expression des gènes embryonnaires précoces et peuvent influencer le phénotype de la progéniture.

I.10.3. Télomères dans l'infertilité masculine

Les télomères de l'ADN spermatique sont primordiaux pour préserver l'intégrité chromosomique et la stabilité génomique, deux éléments indispensables à une fécondation réussie et au développement embryonnaire.

Contrairement à la plupart des cellules somatiques où les télomères se raccourcissent avec l'âge, les télomères des spermatozoïdes ont tendance à s'allonger au fur et à mesure que les hommes vieillissent, ce qui pourrait renforcer la stabilité de l'ADN et diminuer la vulnérabilité aux mutations génétiques. Cette caractéristique unique des télomères des spermatozoïdes a des implications significatives pour la fertilité masculine et la santé de la progéniture (**Bartlett & Yang, 2017**).

Des études ont montré que les hommes infertiles ont souvent des télomères de sperme plus courts que les hommes fertiles, ce qui suggère que la longueur des télomères pourrait servir de biomarqueur pour l'infertilité masculine (**Fernández de la Puente *et al.*, 2023**).

I.10.4. Fragmentation de l'ADN spermatique

La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes fait référence à des lésions, des dommages ou des ruptures dans le matériel génétique des spermatozoïdes, ce qui représente l'un des principaux facteurs d'infertilité masculine en raison de l'altération de la capacité fonctionnelle des spermatozoïdes. Ce phénomène a suscité une grande attention en médecine de la reproduction, car l'analyse conventionnelle du sperme s'est révélée insuffisante dans de nombreux cas.

Les lésions de l'ADN spermatique peuvent se présenter sous la forme de cassures simple ou double brin, qui sont deux entités pathologiques différentes. Les cassures double brin peuvent se produire suite à l'incapacité du système de réparation à corriger les aberrations survenant pendant le remodelage et à l'absence ou au dysfonctionnement des mécanismes de réparation de l'ADN pendant la méiose, tandis que les cassures simple brin résultent généralement de lésions oxydatives (**Kandil & Henkel, 2025**).

I.10.4.1. Causes de la fragmentation d'ADN spermatique

Les origines sont diverses et peuvent être de type intrinsèque ou être provoquées par des facteurs externes. Les facteurs intrinsèques comprennent :

Trois mécanismes principaux, deux agissant nécessairement dans le testicule (apoptose abortive et défauts de maturation de la chromatine des spermatozoïdes) et un pouvant agir également après la spermiation, pendant le transit dans les voies génitales masculines et après l'éjaculation (attaque oxydative) (**Szabó *et al.*, 2023**). On a également émis l'hypothèse qu'un quatrième mécanisme agissait dans l'épididyme et le canal déférent. Dans ce cas, les spermatozoïdes matures briseraient

leur ADN par l'action des nucléases séquestrées dans des structures de type épидидysosomes, dans le cadre d'un processus analogue à l'apoptose (**Gawecka et al., 2015**).

L'apoptose avortée fait référence au fait que les cellules programmées pour mourir ne sont pas éliminées par la phagocytose locale. Des quantités variables de corps apoptotiques sont trouvées, en même temps que des signes d'apoptose dans les spermatozoïdes éjaculés. Plusieurs stimuli induisent l'apoptose du testicule, il a été suggéré qu'elle soit déclenchée aux stades de la spermatogenèse où la machinerie apoptotique, semblable à la machinerie somatique, est encore présente dans les cellules germinales (**Aragwal et al., 2020**).

Un autre mécanisme testiculaire générant le sDF se produit lors du remodelage nucléaire des spermatides, lorsque les protamines remplacent les histones. Afin de promouvoir le remplacement des nucléoprotéines, les topoisomérases coupent l'ADN, produisant des cassures physiologiques qui sont ensuite réparées. Cependant, une déficience dans ce processus pourrait provoquer le maintien des cassures de l'ADN jusqu'aux spermatozoïdes matures (**Gajski et al., 2021**).

Le stress oxydatif est le résultat d'un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), dépassant les défenses antioxydantes et provoquant des dommages aux macromolécules, y compris l'ADN. Il serait responsable de l'augmentation du sDF dans les spermatozoïdes éjaculés par rapport aux spermatozoïdes testiculaires. Le stress oxydatif cause également des dommages à l'ADN lors de la manipulation in vitro des spermatozoïdes, comme la cryoconservation, la sélection et l'incubation.

Les facteurs extérieurs incluent :

- **Âge**

Bien qu'il n'y ait pas de consensus sur la définition de l'âge paternel avancé, le critère le plus utilisé est celui des hommes de plus de 40 ans. Des études ont montré qu'avec l'âge, les mécanismes de remodelage de l'ADN diminuent, ce qui conduit à des spermatozoïdes défectueux. La plupart des articles indiquent une augmentation de la fragmentation de l'ADN avec l'âge paternel avancé (**Gonzalez et al., 2022**).

- **Obésité**

L'obésité est un autre problème qui entraîne une mauvaise qualité du sperme en raison de l'aromatisation périphérique de la testostérone en estradiol dans la graisse sous-cutanée. L'augmentation de la température testiculaire due à la graisse sous-pubienne et les niveaux élevés d'œstradiol peuvent provoquer un hypogonadisme et des lésions de l'ADN des spermatozoïdes (**Morrison et al., 2015**).

- **Varicocèle**

La varicocèle est une dilatation anormale et/ ou tortueuse des veines du plexus pampiniforme, qui touche 15 % des hommes adultes et jusqu'à 80 % des patients souffrant d'infertilité secondaire. Elle est liée à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui endommage

l'ADN des spermatozoïdes et augmente les taux de fragmentation de l'ADN dans le sperme (Huyghe *et al.*, 2023).

- **Cryptorchidie**

La cryptorchidie désigne l'absence de descente d'un ou des deux testicules dans le scrotum avant la naissance, c'est l'anomalie congénitale la plus fréquente des organes génitaux masculins. Des testicules non descendus provoquent l'infertilité masculine et une incapacité à produire des spermatozoïdes, car les testicules nécessitent un environnement plus frais pour leur fabrication (Fawzy *et al.*, 2015).

- **Infections et antécédents infectieux**

Les infections peuvent être à l'origine d'obstruction des voies spermatiques, de production d'anticorps anti-spermatozoïdes et d'une leucospermie qui génère un stress oxydant délétère pour les spermatozoïdes (Dutta *et al.*, 2024).

Les infections virales, y compris celles survenues lors de la récente pandémie de SRAS-CoV-2, constituent une menace potentielle pour la fertilité (Guo *et al.*, 2024).

- **Pollution atmosphérique**

Des études ont suggéré que la qualité du sperme diminue depuis des décennies en raison de facteurs tels que la pollution de l'air, les ondes électromagnétiques, la consommation d'alcool, le stress psychologique etc.

Une étude complète menée par Zhang *et al.* (2020), a démontré que des concentrations plus élevées de polluants dans le plasma étaient associées à un volume séminal plus faible, à une concentration réduite de spermatozoïdes et à une morphologie plus médiocre. En outre, l'étude a révélé une augmentation de l'indice de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Ces résultats ont révélé une forte corrélation entre les niveaux élevés de pollution atmosphérique et l'augmentation de l'indice de fragmentation de l'ADN (DFI).

- **Exposition aux xénobiotiques**

Les xénobiotiques sont des substances présentes dans un organisme mais étrangères à son métabolisme normal. Les xénobiotiques sont connus pour affecter la chromatine des spermatozoïdes et peuvent être classés en agents pharmacologiques, professionnels et environnementaux (Timmermans *et al.*, 2022).

I.10.4.2. Indice de fragmentation de l'ADN

L'importance de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes réside dans son influence directe sur la fécondation et le développement embryonnaire. Contrairement à d'autres cellules, les spermatozoïdes matures ne disposent pas des mécanismes cellulaires nécessaires pour réparer l'ADN endommagé (Stavros *et al.*, 2024).

L'indice de fragmentation de l'ADN (IFD) permet d'évaluer l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes en mesurant le pourcentage de ceux présentant une fragmentation. Des valeurs élevées d'IFD sont associées à une augmentation des lésions de l'ADN des spermatozoïdes (**Will et al., 2011**). Un DFI au-delà de 30 % indique une dégradation significative du sperme (aucune grossesse évolutive n'est envisageable si ce taux dépasse 45 %), alors qu'un DFI inférieur à 3 % reflète une qualité spermique satisfaisante. Les hommes infertiles qui bénéficient du test SDF sont ceux qui n'ont pas d'étiologie connue pour leur infertilité, que les paramètres conventionnels du sperme soient normaux ou anormaux, ceux qui ont des facteurs de risque connus ou une varicocèle clinique, et en cas d'échec de la procréation médicalement assistée (**Agarwal et al., 2023**).

I.10.4.3. Tests de détection de la fragmentation de l'ADN spermatique (sDF)

a) Le test de sperm chromatin structure assay (SCSA)

Ce test utilise l'acridine orange (AO), un fluorescent en vert qui s'intercale dans l'ADN, après une légère acidification induisant la dénaturation de l'ADN. Sous une lumière bleue d'excitation (488 nm). L'AO devient vert quand il est lié à de l'ADN double brin et devient rouge lorsqu'il est lié à l'ADN simple brin. Ainsi, pour chaque cellule, le rapport entre la fluorescence rouge et la fluorescence totale (verte + rouge) de l'AO est calculé et présenté sous la forme d'un histogramme de fréquence. (**Evenson, 2022**)

Ce test ne détecte pas directement la rupture de l'ADN, mais plutôt la susceptibilité de la chromatine spermatique à la dénaturation induite. Toutefois, plus l'ADN est fragmenté, plus il est susceptible d'être dénaturé. Par conséquent, les résultats du SCSA sont en corrélation avec les tests détectant directement les cassures de l'ADN. Le SCSA détecte également les spermatozoïdes présentant une forte colorabilité de l'ADN (HDS), qui est interprétée comme des cellules à l'ADN intact mais à la chromatine immature (**Zhang et al., 2024**).

b) Test TUNEL

Le test TUNEL est une autre des techniques les plus courantes pour évaluer la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Le test repose sur la détection des cassures de brins d'ADN in situ en les marquant avec des fluorochromes ou avec des sondes marquées à la biotine à utiliser avec de la streptavidine-HRP (peroxydase de raifort) et un substrat HRP chromogène.

c) Test de dispersion de la chromatine des spermatozoïdes (SCD)

Le test de dispersion de la chromatine des spermatozoïdes (SCD) est une méthode de microscopie optique utilisé pour évaluer la sensibilité de l'ADN des spermatozoïdes à la dénaturation acide. Le test SCD repose sur le principe selon lequel les boucles d'ADN intactes se dilatent après dénaturation et extraction des protéines nucléaires, alors que lorsque l'ADN est fragmenté, la dispersion ne se produit pas ou est minime (**Zahid et al., 2020**).

d) Test COMET

Le test COMET est une méthode d'évaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique (sDF) dans les spermatozoïdes individuels basée sur la migration différentielle des brins d'ADN cassés

sous l'influence d'un champ électrique en fonction de la charge et de la taille des brins. Le nom du test est lié à l'aspect « comète » au microscope à fluorescence des fragments d'ADN non enroulés colorés qui sont détachés de la tête du spermatozoïde après le mouvement électrophorétique (Gajski *et al.*, 2021).

e) In situ Nick Translation (ISNT)

C'est une technique qui permet de détecter les cassures de brins d'ADN dans les coupes de tissus. Cette procédure implique l'incorporation de nucléotides aux extrémités 3'-hydroxyle des brins d'ADN, prolongeant le brin dans le sens 5' vers 3', et est applicable aux tissus congelés ou fixés au formol et inclus dans la paraffine (Hashimoto & Kanematsu, 2000).

L'ISNT est particulièrement précieux pour sa sensibilité et sa résolution anatomique, qui permettent une analyse topographique détaillée des lésions de l'ADN au niveau cellulaire.

Chapitre II : Matériel et méthodes

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1.Objectif de l'étude

Le but de notre étude est d'évaluer l'impact de la fragmentation de l'ADN spermatique sur la fertilité masculine, en particulier sur les paramètres spermatiques et sur les résultats des techniques de procréation médicalement assistée (PMA).

II.2.Description de l'étude

C'est une étude rétro-prospective, descriptive à visée analytique, portant sur 30 dossiers de patients complets.

II.3.Lieu et période de l'étude

L'étude a été menée au sein du service de procréation médicalement assistée de l'hôpital militaire de Cheraga sur une période allant du mois de mars 2025 jusqu'au mois de juin 2025.

II.4.Population d'étude

L'étude a été réalisée sur 30 hommes et leurs conjointes consultants pour motif d'infertilité. L'ensemble des dossiers médicaux sélectionnés dans notre étude sont soumis à des critères d'inclusion et d'exclusion qui sont :

II.4.1. Critères d'inclusion

Nous avons inclus dans l'étude des hommes mariés consultant pour infertilité, chez lesquels un spermogramme et un test de fragmentation de l'ADN spermatique ont été réalisés.

II.4.2. Critères d'exclusion

Tous les patients avec un dossier médical incomplet.

II.5.Matériel

II.5.1. Matériel biologique

La population étudiée est représentée par 30 couples. L'analyse a été réalisée à partir de leurs dossiers médicaux, en prenant en compte plusieurs variables cliniques.

II.5.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique est représenté par : la verrerie, les appareillages, et les réactifs (**Voir annexe 1**).

II.6.Méthodes

II.6.1. Anamnèse

L'anamnèse consiste à recueillir des informations auprès du patient, c'est une étape essentielle du diagnostic. Chaque patient subit un interrogatoire minutieux permettant ainsi de remplir une fiche de renseignements incluant les données épidémiologiques (âge, profession, tabagisme et

alcool, antécédents médicaux, antécédents chirurgicaux, type et durée d'infertilité) (**Voir annexe 2**).

II.6.2. Spermogramme

Le spermogramme est un examen médical qui permet une appréciation quantitative et qualitative du sperme. C'est le premier test effectué dans le cadre de l'évaluation de l'infertilité masculine. Il permet une double analyse ; évaluation de l'activité sécrétoire à travers la mesure du volume, du pH et de la viscosité et la production gamétique à travers la numération, mobilité et la vitalité du sperme. Le spermogramme est considéré anormal si l'un des paramètres ou plus n'est pas dans les normes d'après les normes du spermogramme selon l'OMS 2021 (**Voir Annexe 3**).

Conditions du prélèvement

Le patient reçoit plusieurs informations et directives sur les conditions nécessaires à la collecte de son sperme, assurant ainsi le bon déroulement et la précision des résultats. Conformément aux recommandations d'usage, la collecte de sperme se déroulera au sein du laboratoire. L'hôpital a trois salles aménagées à cet effet.

- Respect du délai d'abstinence, 4 jours selon les usages du laboratoire.
- Miction avant recueil.
- Nettoyage des mains et des ongles, séchage des mains avec une serviette.
- Recueil par masturbation dans un récipient à usage unique, stérile avec couvercle.
- Chaque échantillon est identifié avec le nom du patient, la date et l'heure du prélèvement.

Evaluation macroscopique

- **La liquéfaction** : une fois collecté, l'échantillon de sperme est placé dans l'étuve à 37°C pendant environ 30 minutes, afin de permettre sa liquéfaction par les protéases prostatiques.
- **Viscosité** : en observant la manière dont le sperme s'écoule à l'extrémité de la seringue, elle est considérée normale si le sperme s'écoule sous forme de gouttes bien séparées, et elle est augmentée lorsqu'elle crée des filaments.
- **Volume** : le volume de l'éjaculat est mesuré à 0.1ml près à l'aide d'une seringue, il est considéré normal lorsqu'il est supérieur à 1,5 ml. En dessous nous parlons d'hypospermie.
- **Couleur** : l'observation de la couleur se fait à l'œil nu, un sperme normal présente une apparence homogène, gris blanchâtre et opalescente.
- **Odeur** : nous utilisons notre odorat pour évaluer ce critère. En général, le sperme a une odeur caractéristique chlorée, mais en présence d'infection l'odeur peut devenir fétide.
- **pH** : la mesure se fera sur une bandelette indicatrice de pH, 30 minutes après l'émission. Une goutte de sperme bien homogénéisé est déposée sur la bandelette, le pH est lu en comparant la couleur obtenue à l'échelle fournie. Selon les normes de l'OMS 2021, le pH doit être compris entre 7,2 et 8.

Evaluation microscopique

• Numération

Le comptage des spermatozoïdes est réalisé à l'aide d'une cellule de Malassez après liquéfaction, le sperme est préalablement dilué à 1/10 (190 µl de formol + 10 µl de sperme) ou 1/20 (380 µl de formol + 20 µl de sperme). Après homogénéisation, 10 µl est introduite dans les deux compartiments de la cellule à l'aide d'une pipette. Après 5 minutes, la lecture est effectuée sous microscope au grossissement x40, nous comptons les spermatozoïdes dans au moins 5 rectangles.

Le calcul de la concentration des spermatozoïdes, exprimée en millions/ml, est obtenu par la formule suivante :

$$N = \frac{n}{v} \times Fd \times 1000$$

- N : Concentration millions/ml,
- n : Moyenne des spermatozoïdes compté.
- v : Volume correspondant à une unité de comptage de la cellule de Malassez
- Fd : facteur de dilution.
- 1000 : conversion de µl à ml

Calcule des cellules rondes (cellules urétrales, cellules immatures de la lignée germinale et leucocytes) : la concentration normale de cellules rondes dans un éjaculats ne doit pas dépasser 10⁶ cellules/ml.

Agglutination : déterminée par l'attachement des spermatozoïdes mobiles entre eux, l'agglutination est examinée en se basant sur au moins 10 champs. Le degré d'agglutination est noté de 1 à 3 croix, et le type est précisé selon la zone d'attachement, la tête, la pièce intermédiaire ou le flagelle ou mixte (**Voir annexe 4**).

• Mobilité

Nous évaluons la mobilité globale et progressive des spermatozoïdes, à l'émission puis 4 heures après. Nous effectuons un examen à l'état frais. Pour cela, nous déposons une goutte de sperme de 20 µl sur une lame, puis nous observons au microscope à grossissement (x 20). L'évaluation est réalisée sur 5 à 10 champs microscopiques et permet d'identifier 4 types de mobilités :

- Grade (a) : rapide progressive ; les spermatozoïdes bougent en ligne droite à travers le champ du microscope.
- Grade (b) : lente et progressive ; les spermatozoïdes bougent lentement, en zigzaguant.
- Grade (c) : mobile non progressive ; les spermatozoïdes bougent mais n'avancent pas
- Grade (d) : immobiles ; les spermatozoïdes sont complètement immobiles.

La mobilité totale (a+b+c) est considérée comme normale si elle est égale ou supérieure à 42%, la mobilité progressive (PR) est la somme des deux catégories (a+b) et est considérée comme normale lorsqu'elle est égale ou supérieure à 30%.

La catégorie immobile (IM) c'est l'absence de mouvement : tête et flagelle immobiles (OMS, 2021).

- **Vitalité**

La détermination du pourcentage de spermatozoïdes viables doit être réalisée via le test à l'éosine-nigrosine, qui se pratique sur du sperme frais.

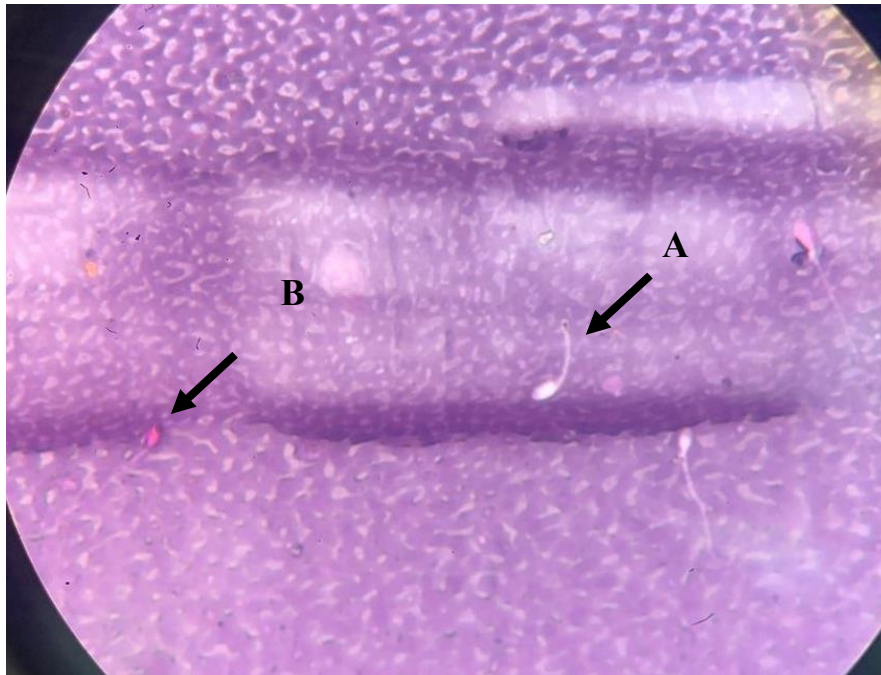


Figure 11: Visualisation microscopique d'un spermatozoïde vivant (A) et mort (B). (Photo originale)

Préparation d'un frottis : Déposer 10 µl de sperme bien homogénéisé à l'extrémité d'une lame, puis mélanger avec 20 µl d'éosine à 1%. Après 30 secondes, 30 µl de nigrosine à 10 % sont ajoutées. En utilisant une seconde lame inclinée à 45°, étaler la goutte afin d'obtenir un frottis mince et uniforme. La lecture des lames se fait sous microscope au grossissement (x 40). Nous comptons 200 spermatozoïdes par échantillon et nous établissons le pourcentage de ceux qui sont morts ainsi que ceux qui sont vivants.

Les spermatozoïdes morts retiennent le colorant et sont teintés en rose, tandis que les spermatozoïdes vivants n'absorbent pas le colorant à travers leur paroi et sont donc incolores. Nous trouvons également des spermatozoïdes partiellement colorés, considérés comme morts (**Figure 11**). La vitalité est considérée normale lorsque le pourcentage de spermatozoïdes vivant égale ou dépasse 54% (OMS, 2021).

II.6.3. Spermocytogramme

Le spermocytogramme est l'étude morphologique des spermatozoïdes. Son objectif est d'évaluer les anomalies morphologiques, en particulier le pourcentage de formes typiques.

Protocole :

- Prélever 10 µl de sperme liquéfié et homogénéisé, puis déposer la goutte sur une lame propre.
- Etaler la goutte de sperme avec une autre lame pour former un frottis fin et régulier.
- Laisser le frottis sécher à l'air libre.
- Fixer le frottis en l'immergeant dans un flacon contenant du méthanol pendant 1 minute, puis laisser sécher à l'air libre.
- Immerger 10 fois pendant 1 seconde dans la solution d'éosine puis égoutter pour éliminer l'excès de colorant.
- Immerger 10 fois pendant 1 seconde dans le bleu de méthylène puis égoutter à nouveau.
- Observer la lame au microscope à l'objectif (x 100) avec l'huile d'immersion, analyser au moins 200 spermatozoïdes.

La lecture s'effectue en respectant la classification de Krüger afin de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux. Le nombre normal de formes typiques est fixé à un résultat supérieur ou égal à 4%. Si le résultat est de moins de 4% nous parlons alors de tératozoospermie (WHO, 2021).

Les spermatozoïdes présentant plusieurs anomalies sont identifiés par des lettres (abcdefghijklmop) où chaque lettre correspond à une anomalie, le n est remplacé par le o pour éviter la confusion avec le m.

IAM ou indice d'anomalies multiples, est l'étape finale de calcul, c'est un facteur prédictif de l'infertilité. Il correspond au rapport du nombre total des anomalies identifiées sur le nombre total de spermatozoïdes anormaux. L'IAM est calculé selon la formule suivante :

$$\text{IAM} = \frac{\text{Nombre total d'anomalies observées}}{\text{Nombre de spermatozoïdes atypiques}}$$

II.6.4. Test de migration-survie (TMS)

Le TMS est un test fonctionnel réalisé en complément du spermogramme. Il permet d'évaluer la capacité des spermatozoïdes à migrer, survivre et maintenir leur mobilité dans un milieu simulant les conditions de l'appareil génital féminin. Il permet également de sélectionner les spermatozoïdes les plus performants pour déterminer la technique de procréation médicalement assistée la plus appropriée.

Protocole

- Les solutions utilisées lors de la centrifugation sont placées à température ambiante et leur manipulation s'effectue dans un tube conique à centrifugation.
- Déposer 2 ml de solution Sil-Select à 90% dans un tube stérile de 15 ml à fond conique, ajouter doucement 2 ml de Sil-Select à 45% sur la première couche en inclinant le tube.
- Assurez-vous de ne pas mélanger les deux couches.
- Déposer soigneusement 2 ml de sperme liquéfié sur les deux phases, centrifuger pendant 20 minutes à 1400 tours/min.
- Enlever le surnageant jusqu'à la hauteur du culot.
- Déposer le culot dans 3 ml de milieu de lavage Sperm Wash puis centrifuger à nouveau pendant 10 minutes à 1800 tours/min.
- Eliminer le surnageant avec une pipette et homogénéiser délicatement le culot.
- Procéder à l'évaluation des spermatozoïdes (évaluation de la mobilité et concentration).

II.6.5. Technique de Sperm Chromatin Dispersion (SCD)

L'étude de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes a été réalisée à l'aide du test de dispersion de la chromatine (SCD) et les résultats ont été exprimés en %DFI.

La méthode SCD évalue la sensibilité de l'ADN spermatique face à la dénaturation acide, par la capacité de la chromatine intacte des spermatozoïdes à créer des halos de dispersions suite à une exposition à l'acide et à une solution lytique.

Protocole

La technique SCD (Sperm Chromatin Dispersion) a été réalisée en suivant le protocole recommandé par la procédure du kit Halosperm G2 commercialisé par halotech DNA-Madrid, Espagne (**Voir annexe 1**).

- Fluidifier le gel d'agarose dans un bain-marie à 95-100°C pendant 5 minutes.
- Les tubes d'ependorf non utilisés seront stockés dans le réfrigérateur avec le reste du kit.
- Diluer l'échantillon de sperme dans une solution tampon de phosphate saline (PBS) à une concentration maximum de 20 M/ml
- Transférer 50 μ l de sperme dilué dans un tube Eppendorf contenant l'agarose, puis mélanger doucement avec une micropipette en évitant la formation de bulles.
- Déposer 8 μ l de la suspension au milieu de la lame et couvrez avec une lamelle délicatement.
- Placer la lame sur une surface froide, puis dans le réfrigérateur à 2-8°C pendant 5 minutes pour solidifier l'agarose.
- Retirer la lame du réfrigérateur et enlever la lamelle délicatement de manière horizontale.
- Immerger la lame dans la solution 1 (DA), incubé pendant 7 minutes sous une hôte puis enlever l'excès de réactif en inclinant la lame doucement.

- Immerger la lame dans la solution 2 (LS), incuber pendant 20 minutes sous une hôte puis enlever l'excès en inclinant la lame.
- Rincer la lame avec de l'eau distillée pendant 5 minutes, puis égoutter en l'inclinant
- Déshydrater successivement la lame dans des bains d'éthanol à 70%, 90%, 100% pendant 2 minutes pour chaque bain, égoutter la lame en l'inclinant et laisser sécher.
- Immerger la lame dans la solution 3 éosine (SSA), et incuber pendant 7 minutes sous une hôte, puis égoutter la lame en l'inclinant
- Immerger la lame dans la solution 4 thiazine (SSB), et incuber pendant 7 minutes sous une hôte, puis égoutter la lame en l'inclinant et laisser sécher à température ambiante.
- Visualiser la lame sous microscope optique à un grossissement (40 x), effectuer la lecture sur 500 spermatozoïdes dans des champs différents.
- Calculer les pourcentages de spermatozoïdes fragmentés et ceux non fragmentés.
- Le pourcentage de fragmentation d'ADN spermatique :

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

Les spermatozoïdes présentant un ADN intact forment de larges halos autour de la tête, tandis que ceux dont l'ADN est fragmenté ne présentent qu'une faible dispersion de chromatine, voire aucune (petits halos ou halos absents) (**Voir annexe 5**).

II.6.6. Analyse statistique

La saisie des données, l'analyse descriptive et le traçage de graphes ont été effectuées à l'aide des logiciels SPSS 27.0 et Microsoft Excel.

Après l'analyse descriptive, en fonction de la nature des variables nous avons appliqué :

- Le test de corrélation de Spearman afin d'étudier les relations entre variables quantitatives,
- Le test de comparaison de moyennes (ANOVA), pour comparer les moyennes entre plusieurs groupes,
- Le test d'association entre variables qualitatives Chi² de Pearson.

Le seuil de signification a été fixé à (**p < 0,05**).

Chapitre III : Résultats et discussion

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Analyse descriptive

III.1.1.1. Age

L'âge des patients de notre étude est de 33 à 60 ans. **(Figure 12)**

La moyenne d'âge est de 40,77 ans, avec des extrêmes de 33 ans (minimum) et 60 ans (maximum). La tranche d'âge comprise entre 31 et 40 est la plus fournie avec 19 patients, soit 63,30% suivie par celle de 41 à 50 ans qui compte 8 patients (26,60%). La tranche d'âge des plus de 51 ans ne représente que 10% des patients de notre étude.

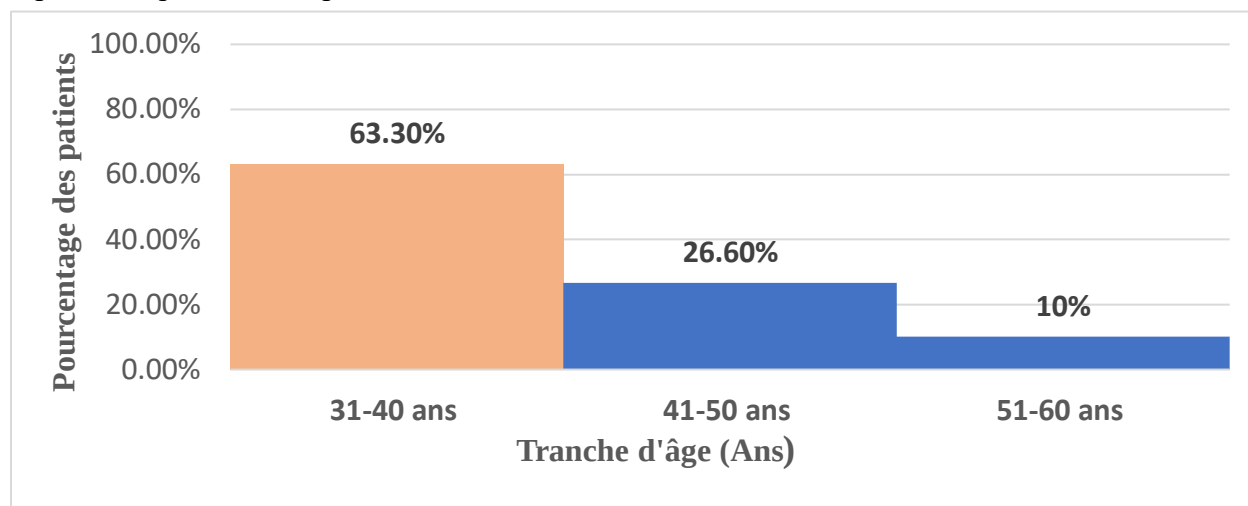


Figure 12: Répartition des patients en fonction de l'âge

III.1.1.2. Type d'infertilité

Nos résultats indiquent une répartition équitable des 30 patients de l'étude concernant le type d'infertilité, avec un taux de 50% (n= 15) présentant une infertilité primaire et 50% (n= 15) une infertilité secondaire, suggérant que l'infertilité peut affecter aussi bien les hommes n'ayant jamais eu d'enfants que ceux qui ont déjà conçu par le passé. **(Figure 13)**

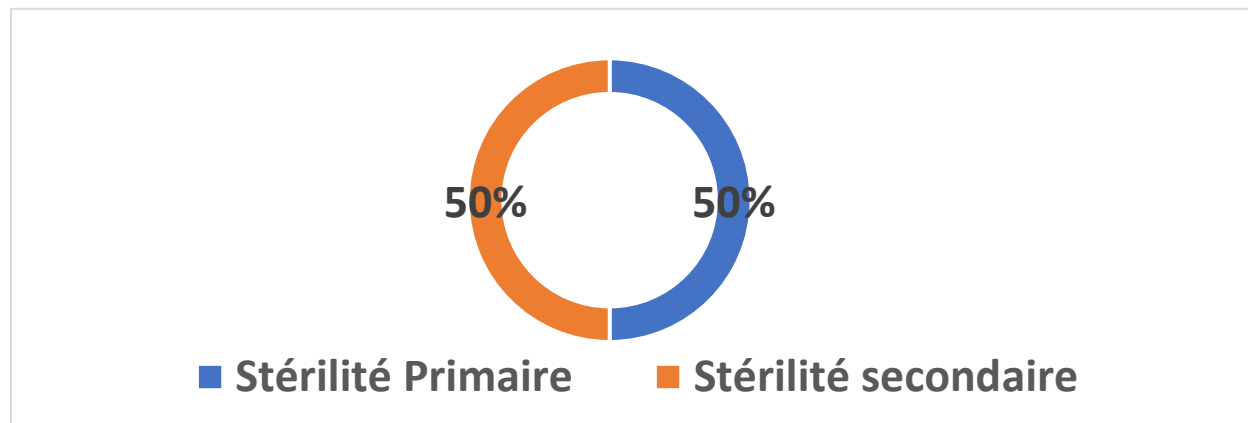


Figure 13: Répartition des patients en fonction du type d'infertilité

III.1.1.3. Durée d'infertilité

La moyenne de la durée d'infertilité est de 4,6 ans $\pm$ 2,58 ans, avec des extrêmes allant de 1 an à 11 ans. La durée la plus fréquente est de 4 à 6 ans (33%), suivi par 2 à 4 ans (30%), 6 à 8 ans constituent 13% des cas et (10%) pour les durées allant de 1 à 2 ans et de 10 à 11 ans, la durée d'infertilité la moins représentée avec seulement 3,30% est de 8 à 10 ans. **(Figure 14)**

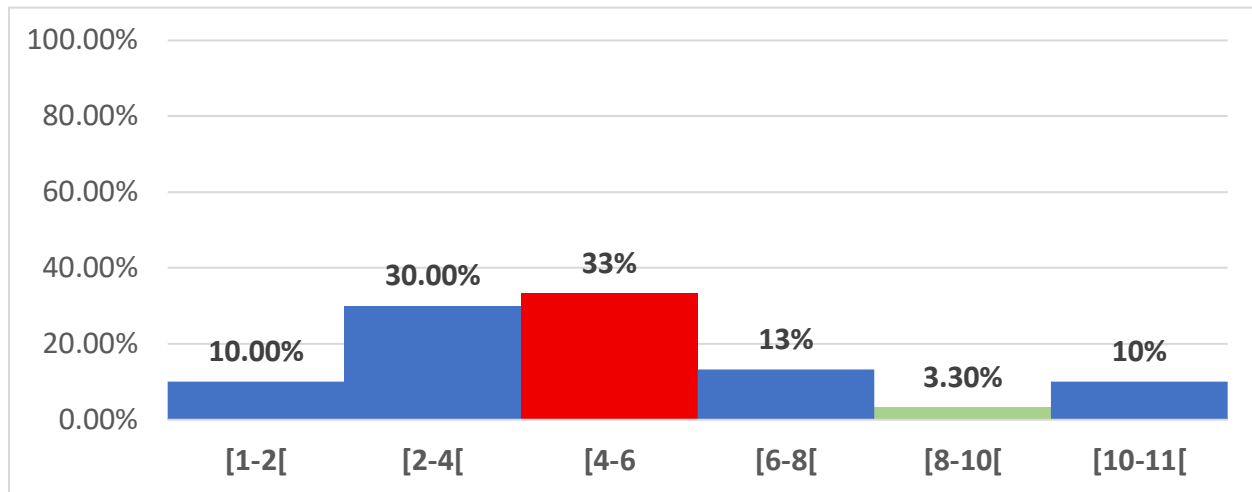


Figure 14: Répartition des patients en fonction de la durée de l'infertilité

III.1.1.4. Antécédents cliniques

Dans notre population, 60% des patients ne présentaient aucun antécédent, par contre 36,70% avaient au moins une pathologie potentiellement liée à l'infertilité. La pathologie la plus fréquente était la varicocèle (22%), nous observons également l'hydrocèle (8%) et l'hypotrophie testiculaire (6,7%). Un seul patient (3,3%) souffrait d'une hernie discale, bien que sans lien direct avec la fertilité, cette condition peut, selon la gravité altérer la qualité de la vie sexuelle. **(Figure 15)**

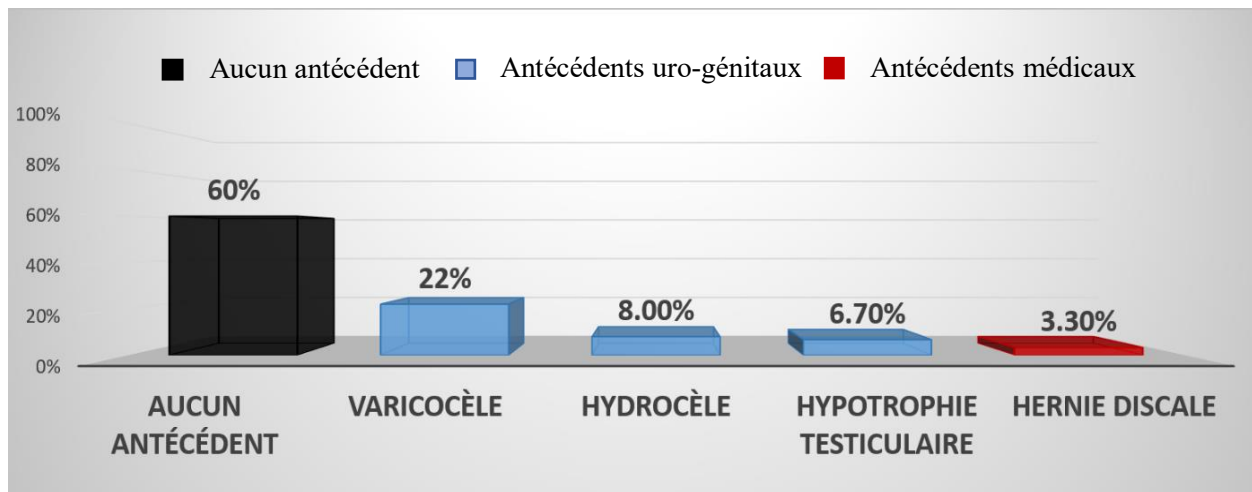


Figure 15: Répartition des patients en fonction des antécédents cliniques

III.1.1.5. Consommation de tabac

Concernant le statut tabagique, près de la moitié des patients soit 46,7% des patients sont tabagiques, ce qui indique une forte prévalence du tabagisme dans notre population. 53,3 % ne l'étaient pas, ce qui montre que même si ce facteur est important il n'explique pas toujours l'infertilité masculine. **(Figure 16)**

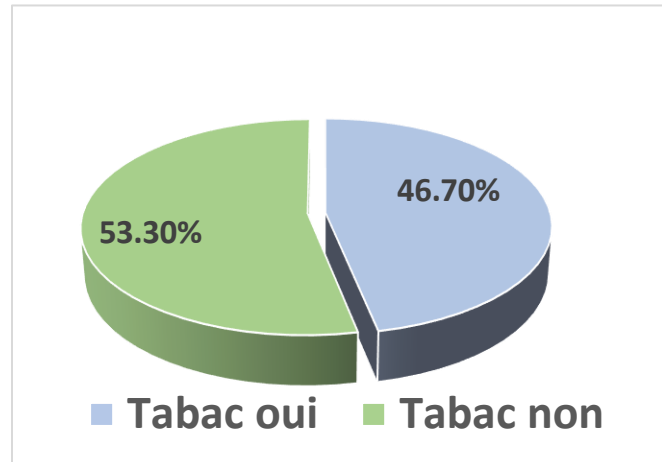


Figure 16: Répartition des patients selon leurs statuts tabagiques

III.1.1.6. Exposition professionnelle et facteurs de risque

Sur l'ensemble de nos patients exclusivement composés de militaire, 73,30% avaient des postes associés à une forte exposition à des facteurs délétères pour la fertilité, tels que l'exposition à des températures extrêmes, le stress physique ou psychologique. Toutefois 30% exerçaient des fonctions à faibles exposition délétère. **(Figure 17)**

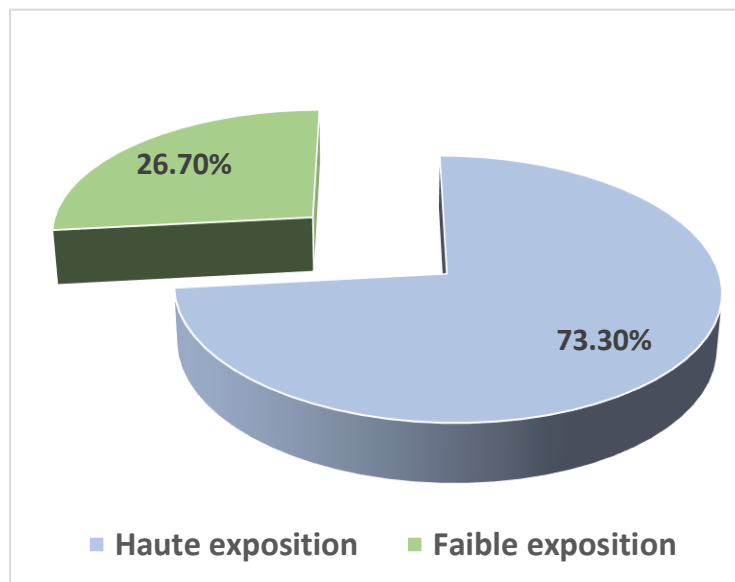


Figure 17: Répartition des patients selon le niveau d'exposition professionnelle aux facteurs délétères pour la fertilité.

III.1.1.7. Résultats du spermogramme

Dans notre étude, 18 patients soit 60% présentaient un spermogramme normal, tandis que 12 patients soit 40% montraient des altérations des paramètres spermatique (**Figure 18**).

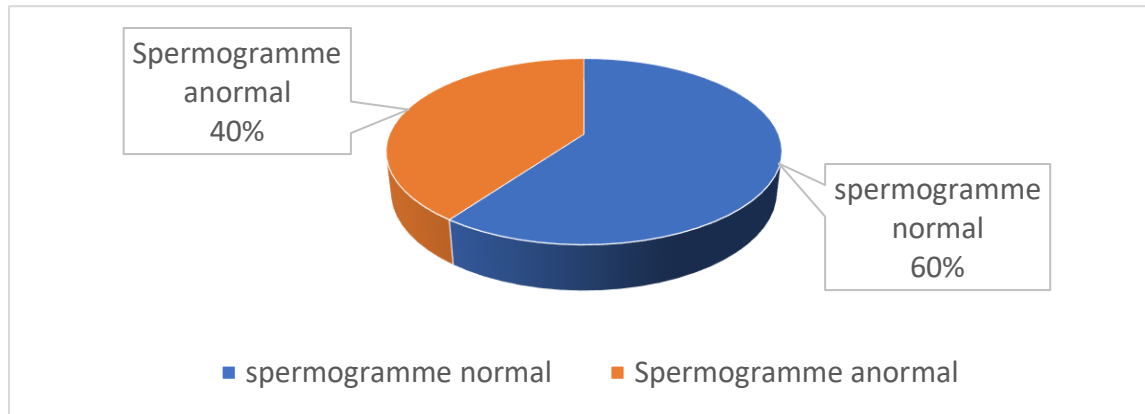


Figure 18: Répartition des patients selon le résultat du spermogramme

III.1.1.8. Volume

Les résultats du spermogramme indiquent que la majorité (90 %) des patients présentent un sperme de volume normal, en revanche 10% présentent une hypospermie soit un volume <1,4 ml. (**Figure 19**) La moyenne du volume spermatique est de 3,54 ml $\pm$ 1,5 ml avec un minimum de 0,9 ml et un maximum de 7 ml.

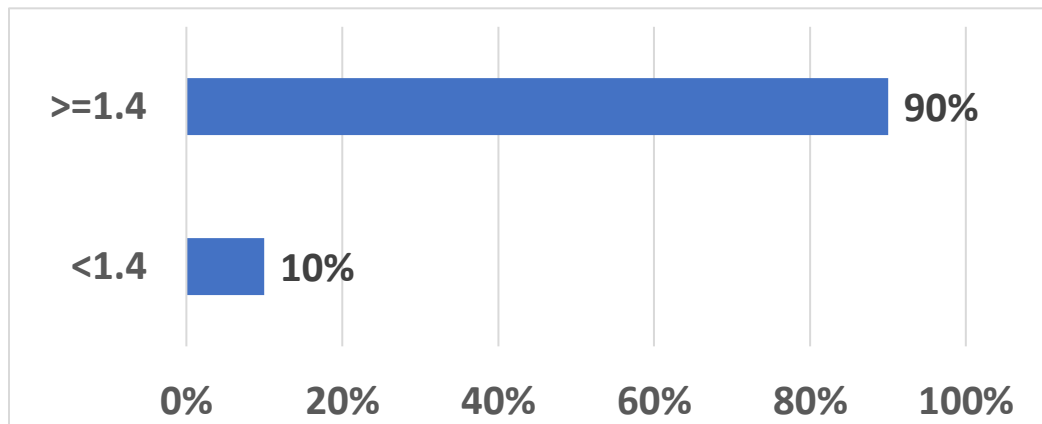


Figure 19: Répartition des patients selon le volume spermatique

III.1.1.9. Mobilité

Dans notre population, 36,7% des patients (n = 11) présentaient une mobilité progressive réduite < 30%. Tandis que 63,3% avaient une mobilité ≥ 30 . La moyenne de la mobilité progressive est de 35,21 $\pm$ 16,54 % avec un minimum de 10% et un maximum de 80%, ce qui est assez faible par rapport aux seuils de référence de l'OMS.

Concernant la mobilité totale, 23,3% soit 7 patients présentaient une asthénospermie, ce qui indique une altération du mouvement spermatique. Cependant, la moyenne de la mobilité totale ($51,21\% \pm 13,05\%$), avec des valeurs allant de 30% à 90% reste globalement satisfaisant, suggérant que la plupart des patients maintiennent une certaine mobilité. (Figure 20)

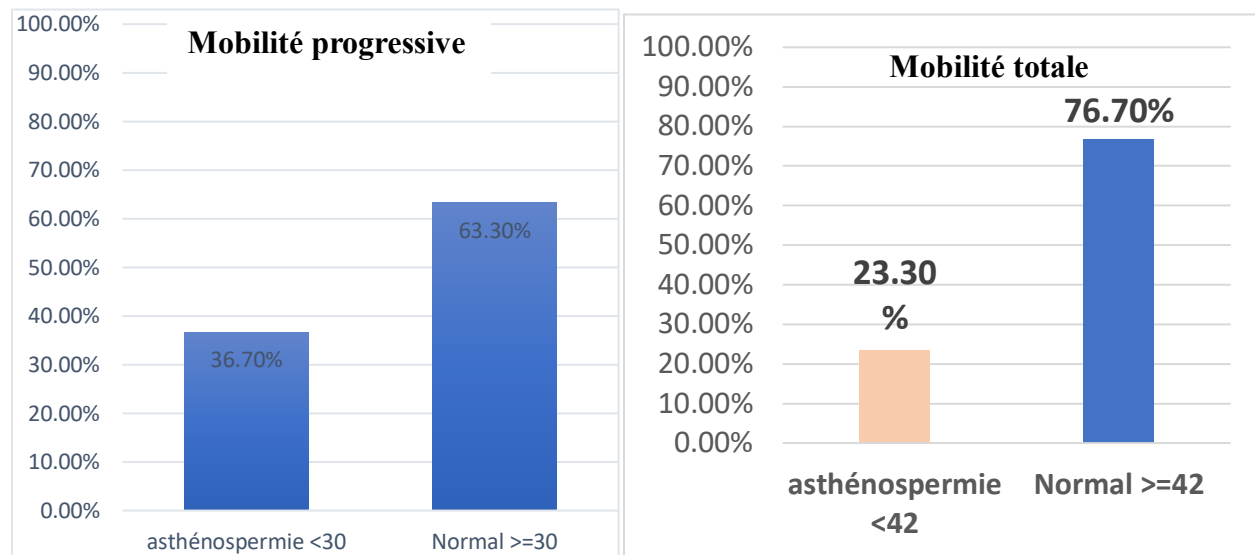


Figure 20: Répartition des patients selon la mobilité

III.1.1.10. Concentration

D'après la figure 21, 73,3% des patients ont une concentration dans la norme soit 16 à 200 millions/ml, 13,3% présentent une concentration spermatique située entre 6 à 16 millions/ml suivi de 10% seulement qui souffrent d'une oligospermie sévère soit une concentration égale ou inférieure à 5 millions/ml, 3,3% ont une polyspermie avec une concentration égale ou supérieure à 200 millions/ml (Figure 21).

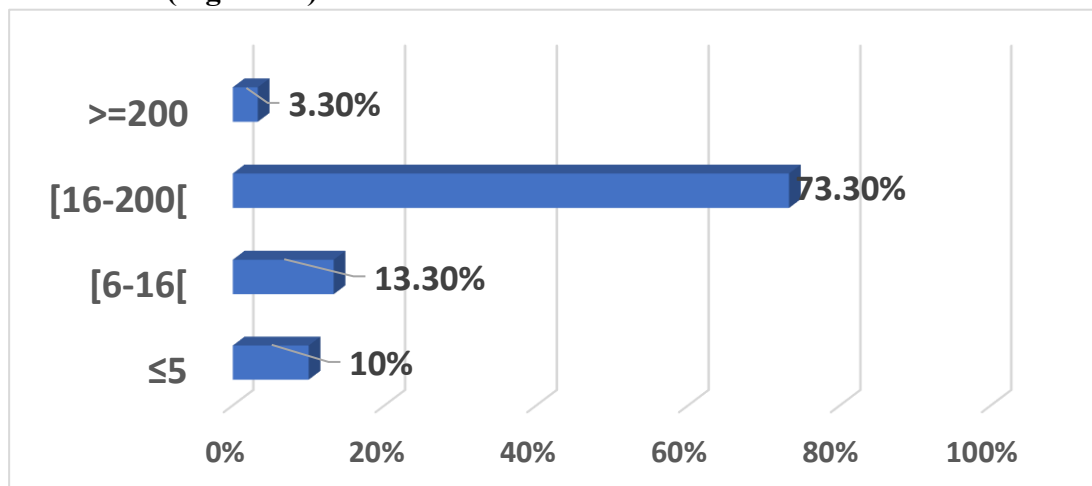


Figure 21: Répartition des patients selon la concentration

La moyenne de la concentration chez les 30 patients est de 54,96 million/ml $\pm$ 61,20 millions /ml avec un minimum de 0,32 M/ml et un maximum de 278,60 M/ml.

III.1.1.11. Vitalité

Dans notre population 100% des patients présentaient une vitalité normale ≥ 54 , définie selon les critères de l'OMS 2021.

La moyenne de la vitalité était de $76,16\% \pm 9,86\%$ avec un minimum de 59% et un maximum de 93%, indiquant une bonne viabilité globale des spermatozoïdes chez les patients inclus dans l'étude. (Figure 22)

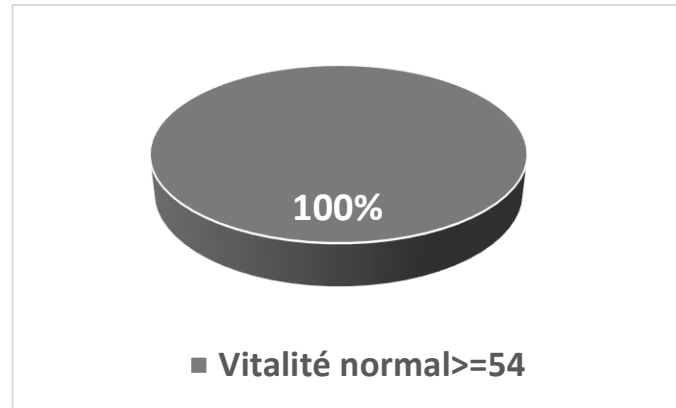


Figure 22: Répartition des patients selon la vitalité

III.1.1.12. Morphologie

Dans notre échantillon 13,3% des patients ($n = 4$) ont présenté une tératospermie, définie par un pourcentage de spermatozoïdes de morphologie normale inférieur à 4 %, selon les critères de l'OMS 2021. (Figure 23)

La moyenne du pourcentage de formes normales dans l'ensemble de la population était de $5,03 \pm 2,32\%$, avec des valeurs allant de 2 % à 12 %, traduisant une altération modérée à sévère de la morphologie dans certains cas.

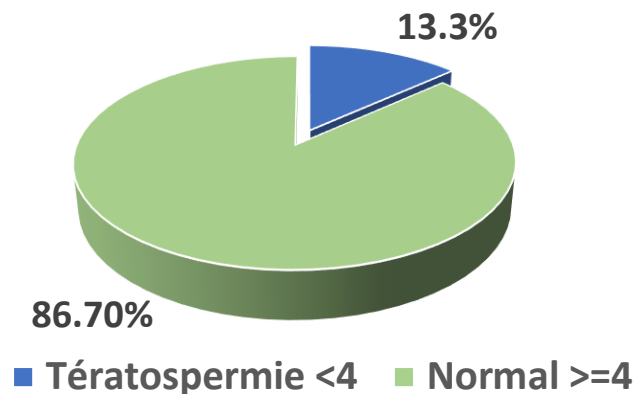


Figure 23: Répartition des patients selon la morphologie

III.1.1.13. Indice d'anomalie multiple (IAM)

Sur la totalité de notre population, 67 % des patients (n = 20) avaient un indice d'anomalies multiples (IAM) supérieur à 1,6 indiquant la présence de diverses anomalies morphologiques associées dans un seul spermatozoïde. La moyenne de l'IAM est de $1,59 \pm 0,1$ avec des valeurs allant 1,34 à 1,8 indiquant une altération morphologique chez une grande proportion de patients.

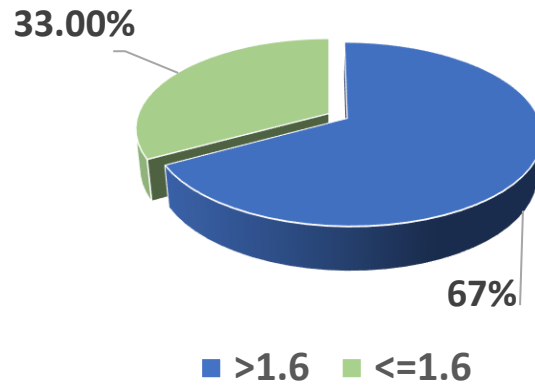


Figure 24: Répartition des patients selon l'indice d'anomalie multiple

III.1.1.14. Fragmentation de l'ADN spermatique

Les patients ont été classés en trois groupes en fonction du DFI des spermatozoïdes : $DFI < 15\%$ indiquant une faible fragmentation de l'ADN spermatique, $15\% > DFI < 30\%$ indique une fragmentation modérée et $DFI > 30\%$ une fragmentation sévère, rapportés selon le modèle de **Yang et al., (2019)**.

La moyenne de la DFI est de $22,03 \pm 19\%$ avec un minimum de 4,5% et un maximum de 89%. Cette répartition montre que la majorité des patients (53%) avaient une fragmentation faible, 33 % des patients (n = 10) avaient une fragmentation modérée de 15 suivis de 13,3% des patients (n = 4) présentaient une fragmentation sévère >30 (**Figure 25**).

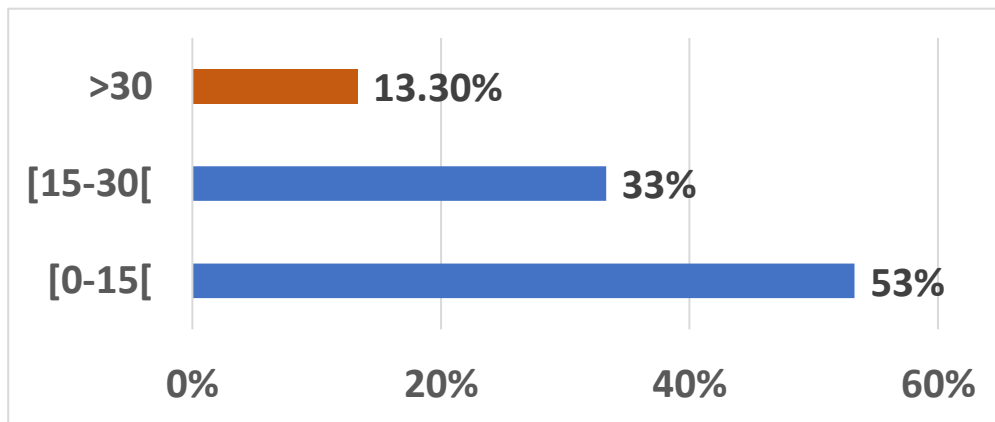


Figure 25: Répartition des patients en fonction du seuil de la fragmentation de l'ADN (DFI)

III.1.1.15. Taux de fécondation

Parmi les 30 couples, 24 seulement ont consenti à une tentative de procréation médicalement assistée par injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI), toutefois une patiente a présenté une ponction ovarienne blanche, empêchant toute récupération ovocytaire, et donc a été exclue de l'analyse. La majorité des patientes 59% présentent un taux de fécondation compris entre 50 à 75%, tandis que 22,7% ont un taux inférieur à 50%, indiquant une fécondation faible, seuls 13,3% atteignent des taux élevés (> 75%). **(Figure 26)** La moyenne du taux de fécondation chez les 23 épouses est de $57,58\% \pm 17,67$ avec des valeurs allant 25% à 84,1%.

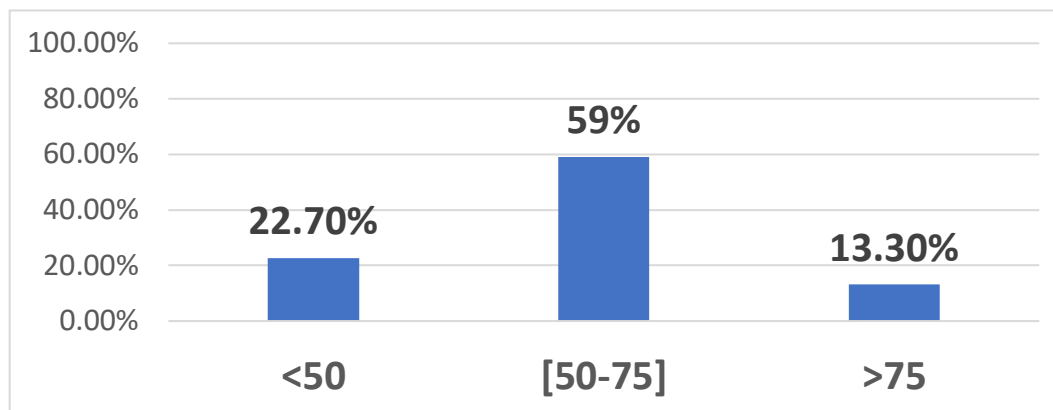


Figure 26: Répartition des patientes selon le taux de fécondation

III.1.1.16. Qualité des embryonnaire et grossesse

La répartition des patientes selon la qualité embryonnaire, représentée dans la figure 27 indique que celles ayant des embryons de qualité B sont majoritaires, constituant (43%) de l'échantillon total. Les patientes avec des embryons de qualité C représentent (21,70%) de la population, suivi par les embryons A et D qui représentent (17%) et (13,04%) respectivement. (4,30%) des cas n'ont pas d'embryons. **(Figure 27)** Sur les 23 couples ayant poursuivi le parcours de PMA, seulement 34,70% ont obtenu une grossesse.

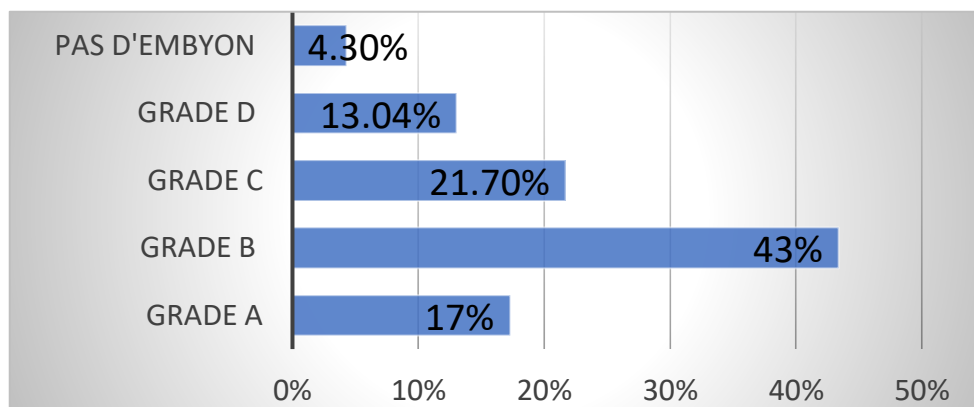


Figure 27: Répartition des patientes selon la qualité embryonnaire

Nous avons utilisé la même classification des embryons (grade A, B, C, D) que celle décrite par **Kim et al., (2019)**.

III.1.2. Corrélation entre l'âge et la fragmentation de l'ADN spermatique

La corrélation réalisée entre l'âge des patients et le taux de la fragmentation de l'ADN spermatique, à montrer une corrélation positive non significative : $r = 0,1$; $p = 0,6$. Dans notre étude aucune corrélation significative entre l'âge des hommes et le DFI n'a été établi. (**Figure 27**)

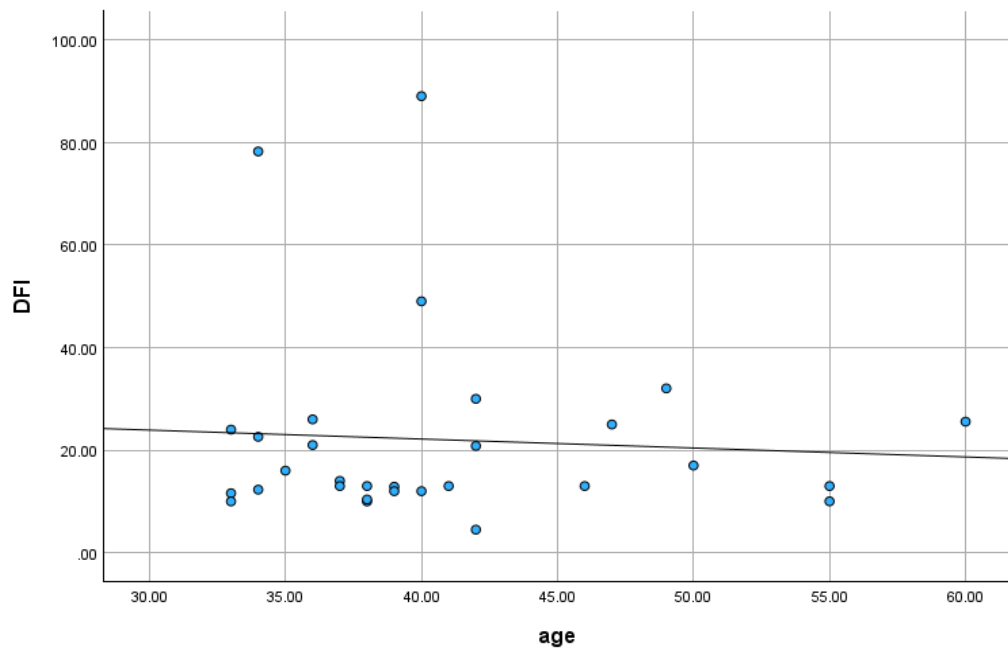


Figure 28: Corrélation du DFI avec l'âge des patients.

Dans le but de comparer la moyenne d'âge des patients selon les trois seuils de fragmentation de l'ADN, nous avons réalisé le test ANOVA à un facteur. Aucune différence significative n'a été observée avec ($p = 0,922$), confirmant ainsi l'absence de relation entre l'âge et le taux de fragmentation dans notre échantillon.

Tableau 2 : Répartition des moyennes d'âge selon les seuils de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI)

Seuils de fragmentation	Moyenne d'âge	p-value
<15	40,31 ans $\pm$ 6,61 ans	Test Anova à 1 facteur p = 0,922
[15-30]	41,50 ans $\pm$ 8,67 ans	
>30	40,75 ans $\pm$ 6,18 ans	

III.1.1.17. Durée de l'infertilité et le DFI

L'analyse de corrélation de Spearman n'a pas mis en évidence de lien significative entre la durée de l'infertilité et le DFI (**r = 0,30 ; p = 0,10**). Nous n'avons donc pas trouvé de corrélation entre la durée d'infertilité et l'âge des patients dans notre échantillon.

Tableau 3: Répartition des patients selon les moyennes de la durée d'infertilité selon les seuils de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI)

DFI	Moyenne de la durée d'infertilité	p-value
<15	3,94 ans $\pm$ 2,48ans	Test Anova à 1 facteur p = 0,022
[15-30]	4,2 ans $\pm$ 1,54 ans	
>30	7,57 ans $\pm$ 3,3 ans	

Cependant, l'analyse comparative des moyennes de DFI selon des classes de durée d'infertilité a révélé des différences significatives (**p = 0,022**), suggérant que la fragmentation de l'ADN spermatique serait plus élevée chez les patients ayant une infertilité de longue durée. Ces résultats indiquent que la durée prolongée de l'infertilité pourrait être associée à une altération de l'intégrité de l'ADN spermatique.

III.1.3. Corrélation entre la mobilité progressive et la fragmentation de l'ADN spermatique

Il existe une corrélation inverse et significative ($r = -0,57$; $p = 0,001$) entre le taux de DFI et la mobilité progressive des spermatozoïdes. Plus le taux de fragmentation de l'ADN est élevé, plus la mobilité progressive est diminuée. (Figure 29)

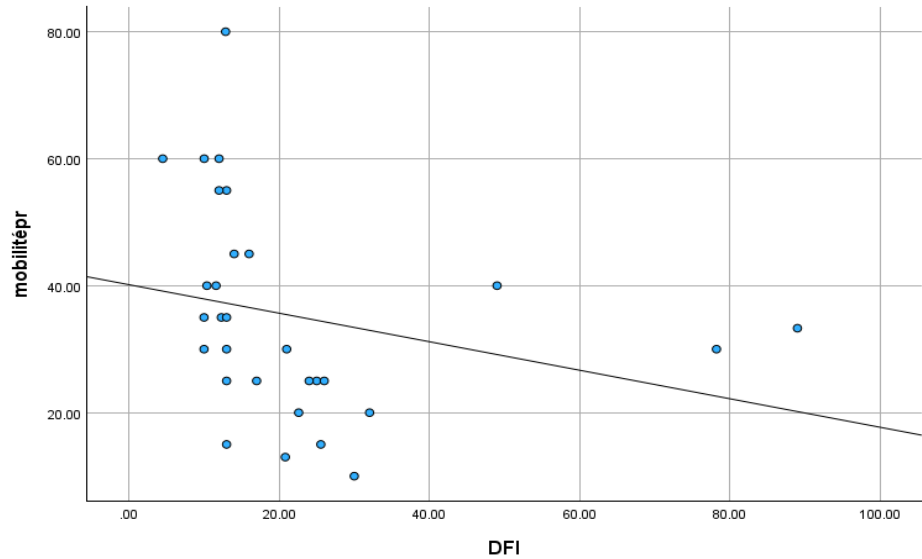


Figure 29: Corrélation entre la mobilité progressive (a+b) en fonction du DFI

III.1.4. Corrélation entre le volume et fragmentation de l'ADN spermatique

Nos résultats montrent une corrélation négative non significative entre le volume spermatique et le DFI, selon le test de Spearman ($r = -0,027$; $p = 0,88$).

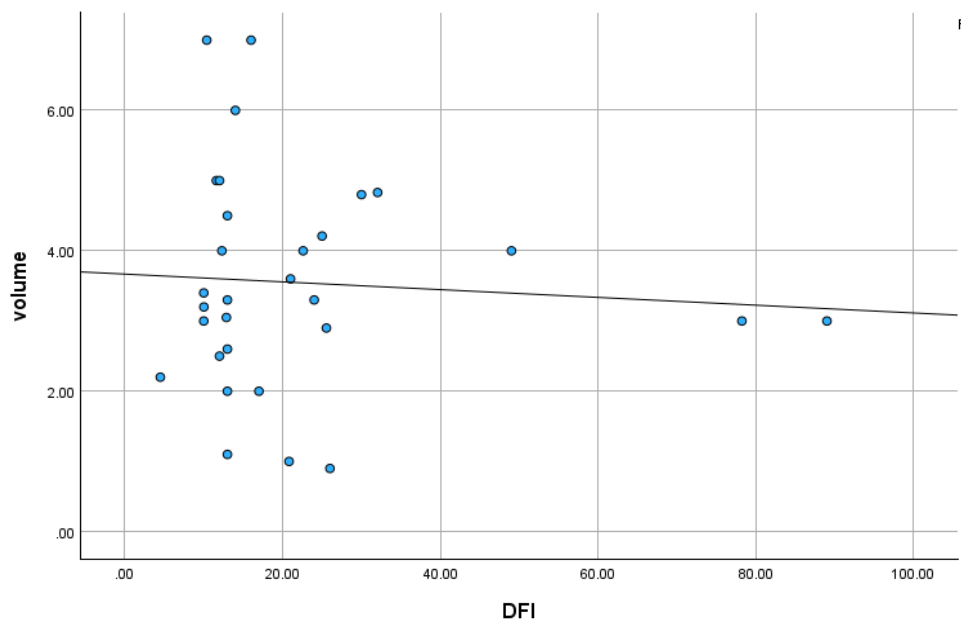


Figure 30: Corrélation entre le volume et le DFI

- **Mobilité progressive et fragmentation de l'ADN spermatique**

Une analyse de type tableau croisé a été réalisée dans le but d'étudier la relation entre les seuils de DFI et la mobilité progressive selon les normes de la dernière édition de l'OMS. Nos résultats montrent que 80% des patients avec un DFI entre 15 et 30% présentent une mobilité progressive inférieure à 30%, contre seulement 25% chez ceux ayant un DFI > 30%, et 12,5% chez ceux ayant un DFI <15%. Ce test a révélé une association significative avec (**p = 0,02**).

Tableau 4: Répartition des patients selon la mobilité progressive et le DFI

Paramètre	Fragmentation Faible <15		Fragmentation Modérée [15-30]		Fragmentation Élevée >30		Total
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif
<30	2	12,5%	8	80%	1	25%	11
>=30	14	87,5%	2	20%	3	75%	19
Total	16	100%	10	100%	4	100%	30

- **Volume et fragmentation de l'ADN spermatique**

Le test du Chi² a révélé l'absence d'association statistiquement significative concernant la relation entre le volume spermatique et le DFI (**p = 0,40**).

Tableau 5: Répartition des patients selon le volume spermatique et le DFI

Paramètre	Fragmentation Faible <15		Fragmentation Modérée [15-30]		Fragmentation Élevée >30		Total
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif
<1,4 ml	1	6,3%	2	20%	0	0%	3
>=1,4ml	15	93,8%	8	80%	4	100%	27
Total	16	100%	10	100%	4	100%	30

- **Concentration et fragmentation de l'ADN spermatique**

Les résultats montrent que 40% des patients avec un DFI compris entre 15 et 30% présentaient une oligospermie, contre 25% des DFI > 30% et 12,5% chez les DFI <15%. Toutefois le test du Chi² n'a pas révélé de différence significative entre ces groupe (**p = 0,27**).

Tableau 6: Répartition des patients selon la concentration et le DFI

Paramètre	Fragmentation Faible <15		Fragmentation Modérée [15-30]		Fragmentation Élevée >30		Total
Concentration	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif
<16	2	12,5%	4	40%	1	25%	7
>=16	14	87,5%	6	60%	3	75%	23
Total	16	100%	10	100%	4	100%	30

- **Morphologie et fragmentation de l'ADN spermatique**

Nous observons que 25% des patients ayant un DFI > 30% présentaient une tératospermie (<4% de forme normale), contre 20% dans la catégorie 15-30%, et 6,3 chez ceux ayant un DFI<15%. Le test du Chi² n'a pas mis en évidence de lien significatif (**p = 0,461**).

Les résultats du test ANOVA montrent des moyennes relativement proches : 5,38% pour les DFI <15%, 4,10% pour les DFI entre 15-30% et 6% pour les DFI > 30%. Nous n'avons observé aucune différence significative (**p = 0,275**).

Tableau 7: Répartition des patients selon la morphologie et le DFI

Paramètre	Fragmentation Faible <15		Fragmentation Modérée [15-30]		Fragmentation Élevée >30		Total
morphologie	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif
<4	1	6,3%	2	20%	1	25%	4
>=4	15	93,8%	8	80%	3	75%	26
Total	16	100%	10	100%	4	100%	30

- **Vitalité et fragmentation de l'ADN spermatique**

Chez l'ensemble des 30 patients étudiés, la vitalité des spermatozoïdes était $\geq 54\%$. La comparaison des moyennes de vitalité entre les trois groupes de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI) révèle une diminution progressive avec l'augmentation du DFI, le groupe avec un DFI $<15\%$ avait une moyenne de 79,06%, dans le groupe DFI 15-30% la moyenne était de 74%, le groupe avec un DFI $> 30\%$ présentait une moyenne de 70%. Cependant sur le plan statistique cette différence n'était pas significative ($p = 0,183$).

- **Indice d'anomalies multiples et fragmentation de l'ADN spermatique**

La comparaison des moyennes de l'indice d'anomalies multiples (IAM) selon les seuils de DFI réaliser par ANOVA, montre des valeurs proches : 1,56 pour les patients ayant un DFI inférieur à 15%, pour ceux ayant un DFI entre 15 et 30% la valeur était de 1,64 et 1,58 pour les DFI $\geq 30\%$, aucune différence statistiquement significative ($p = 0,216$).

L'association entre l'IAM et le DFI, réalisée par le Chi2, montre qu'une grande majorité de patients soit 90% ayant un DFI compris entre 15 et 30% présente un IAM $\geq 1,60$, suggérant une prédominance des anomalies morphologiques dans ce groupe. Par contre, chez ceux ayant un DFI $\geq 30\%$, la répartition est équilibrée avec 50% présentant un IAM $< 1,60$ et 50% un IAM $\geq 1,60$. dans le groupe $< 15\%$, 56,3% des patients ont un IAM élevé ($\geq 1,60$) versus 43,8% avec un IAM $<1,6$. Ces différences ne sont pas significatives ($p = 0,155$).

Tableau 8: Répartition des patients selon l'indice d'anomalie et le DFI

Paramètre	Fragmentation Faible <15		Fragmentation Modérée [15-30]		Fragmentation Élevée >30		Total
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif
$<1,6$	7	43,8%	1	10%	2	50%	10
$\geq 1,6$	9	56,3%	9	90%	2	50%	20
Total	16	100%	10	100%	4	100%	30

- **Tabagisme et fragmentation de l'ADN spermatique**

Parmi les patients présentant un DFI > 30%, 75% étaient fumeurs, tout comme 70% des patients ayant un DFI compris entre 15-30%. Par contre, dans le groupe DFI<15, 75% des patients n'étaient pas fumeur. Le test du Chi² a révélé une association significative (**p = 0,039**).

Tableau 9: Répartition des patients selon le tabagisme et le DFI

Paramètre	Fragmentation Faible <15		Fragmentation Modérée [15-30]		Fragmentation Élevée >30		Total
Tabac	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif
Oui	4	25%	7	70%	3	75%	14
Non	12	75%	3	30%	1	25%	16
Total	16	100%	10	100%	4	100%	30

- **Taux de fécondation et fragmentation de l'ADN spermatique**

Il a été observé que 71,4% des patients présentant un DFI modéré (15-30%) avaient un taux de fécondation entre 50 et 75%, tandis que 100% des patients ayant un DFI >30 ont obtenu un taux de fécondation <50%. De même, 66,6% des patients ayant un DFI<15% ont atteint un taux de fécondation situé entre 50% et 75%, ce qui indique que les meilleurs résultats de fécondation ont été observés dans le groupe à DFI faible ou modéré. Le test du Chi² a mis en évidence une relation significative (**p =0,013**).

Tableau 10: Répartition des patients selon le taux de fécondation et le DFI

Paramètre	Fragmentation Faible <15		Fragmentation Modérée [15-30]		Fragmentation Élevée >30		Total
Taux de fécondation	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif
< 50%	2	16,6%	0	0%	3	100%	5
[50-75%]	8	66,6%	5	71,4%	0	0%	13
> 75%	2	16,6%	3	28,6%	0	0%	5
Total	12	100%	8	100%	3	100%	23

- **Qualité embryonnaire et fragmentation de l'ADN spermatique**

Il s'avère que 100% des patients présentant un DFI >30 ont donné des embryons de mauvaise qualité (grades C et D), tandis que 83,3% des patients avec un DFI <15% ont obtenus des embryons de bonne qualité (grades A et B). Le groupe ayant une fragmentation modérée (15-30%) présentaient une répartition équilibrée, 57,1% des embryons de bonne qualité et 42,9% de qualité inférieure.

Le test du Chi² a montré une association significative entre le DFI et la qualité embryonnaire (**p = 0,025**).

Tableau 11: Répartition des patients selon la qualité embryonnaire et le DFI

Paramètre	Fragmentation Faible <15		Fragmentation Modérée [15-30]		Fragmentation Élevée >30		Total
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif
Grade A et B	10	83,3%	4	57,1%	0	0%	14
Grade C et D	2	16,7%	4	42,9%	3	100%	9
Total	12	100%	8	100%	3	100%	23

- **Grossesse et fragmentation de l'ADN spermatique**

Les patients avec un DFI entre 15-30% soit 42,9% ont permis d'obtenir une grossesse, contre 38,5% des patients avec un DFI <15%, aucun cas de grossesse concernant les patients présentant un DFI >30. Cependant, le test du Chi² n'a pas montré de différence significative (**p = 0,38**).

Tableau 12: Répartition des patients selon la grossesse et le DFI

Paramètre	Fragmentation Faible <15		Fragmentation Modérée [15-30]		Fragmentation Élevée >30		Total
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif
Oui	5	38,5%	3	42,9%	0	0%	8
Non	8	61,5%	4	57,1%	3	100%	15
Total	13	100%	7	100%	3	100%	23

III.2. Discussion générale

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de la fragmentation de l'ADN spermatique sur la fertilité masculine, en particulier sur les paramètres spermatiques et les résultats des techniques de procréation médicalement assistées (PMA).

Dans notre population, l'âge moyen des patients était de $40,77 \pm 7,08$ ans, la tranche d'âge la plus représentée étant celle des 31 à 40 ans, représentant plus de la moitié de notre population (63,3 %). La durée moyenne d'infertilité dans notre étude est de $4,6 \pm 2,58$ ans, qui est une durée relativement longue indiquant un retard dans la prise en charge des couples infertiles, ce qui peut aggraver le pronostic. Concernant le type d'infertilité la répartition était équilibrée entre l'infertilité primaire et l'infertilité secondaire avec 50 % dans chaque catégorie, nos résultats diffèrent de certaines études comme celle de **Öztekin et al. (2019)**, une étude turque sur 406 patients, où ils ont rapporté une prédominance de l'infertilité primaire avec 77,3%.

D'après plusieurs études, la varicocèle observée chez 22% de nos patients représente l'une des pathologies corrigibles les plus retrouvées dans le contexte de l'infertilité masculine, elle affecte la fertilité en augmentant le stress oxydatif, altère la spermatogenèse et donc associée à une fragmentation accrue de l'ADN (**Huyghe et al., 2023**). Cependant, il est important de noter que dans notre population 60% des patients ne présentaient aucun antécédent médical ou chirurgical particulier, suggérant que l'infertilité masculine est souvent idiopathique (**Raperport et al., 2024**).

L'évaluation des paramètres spermatiques a révélé que 60% des patients présentaient un spermogramme normal, conformément aux critères de référence de l'OMS (2021). La majorité soit 90 % avaient un volume spermatique normal, tandis que 10 % présentaient une hypospermie ($< 1,4$ ml). Concernant la mobilité totale, 23,3% des patients avaient une asthénospermie, confirmant donc qu'une mobilité altérée reste l'une des anomalies les plus fréquente dans l'infertilité masculine.

La majorité (73,3%) des patients avaient une concentration normale entre 16 à 200 millions/ml, en revanche 13,3 % présentés une oligospermie de 6 à 16 millions/ml et 10% souffraient d'oligospermie sévère, on a noté un cas de polyspermie, pour la vitalité elle était dans les normes chez tous les patients, indiquant que malgré les anomalies de mobilité ou de concentration chez quelque cas, le pourcentage de spermatozoïdes vivants est préservé.

Pour le spermocytogramme, 13,3% des patients présentaient une tératospermie, et plus de la moitié soit 67 % des patients avaient un indice d'anomalies multiples (IAM) $> 1,6$ indiquant la présence de plusieurs anomalies morphologique dans un seul spermatozoïde. Ces anomalies pourraient altérer la capacité des spermatozoïdes à féconder l'ovocyte.

D'après nos résultats l'infertilité masculine ne résulte pas seulement d'anomalies visibles au spermogramme, par conséquent la fragmentation de l'ADN spermatique peut compromettre la fertilité même avec des paramètres spermatiques normaux.

Près de la moitié des patients 46,7 % étaient tabagiques, ce qui confirme la forte prévalence du tabagisme chez les hommes infertiles. Toute fois 53,3% n'étaient pas fumeur, indiquant que le tabac, même si important ne peut à lui seul expliquer tous les cas d'infertilité masculine, comme le confirme une étude suédoise ayant étudié 381 hommes et n'ayant pas trouvé de corrélation significative entre le DFI et la consommation de tabac (**Axelsson et al., 2022**).

De plus, le milieu professionnel militaire de nos patients a révélé une exposition environnementale importante : 73,3 % occupaient des postes exposés à des facteurs délétères pour la fertilité, comme les températures extrêmes, le stress physique intense et éventuellement des polluants environnementaux. Une récente étude menée par **Dunn et al. (2025)**, auprès des militaires a mis en évidence un impact négatif de certaines expositions dans le milieu professionnelle sur les paramètres spermatique, cette étude présente des résultats similaires au notre, pour ce qui est de la baisse du nombre de spermatozoïdes mobiles, de plus les militaires assignés dans des régions au climat extrême présentaient une réduction du volume spermatique. Ces résultats confirment l'impact éventuel des facteur environnementaux professionnels, en particulier dans un cadre militaire, sur l'altération de la qualité du sperme, ce qui est cohérent avec les tendances notées au sens de notre population d'étude.

Les données concernant la qualité de l'ADN spermatique de notre groupe d'étude sont présentées en suivant un modèle à trois classes (**Yang et al., 2019**). 33 % des patients ont un DFI entre 15 et 30%, un peu plus de la moitié (53%) avaient une fragmentation <15 suivis de 13.3% des patients présentaient une fragmentation sévère >30. La moyenne est de $22.03\% \pm 19\%$ avec un minimum de 4.5% et un maximum de 89%.

Dans notre étude, le taux moyen de fécondation était de 57,58 %, la majorité des patientes (près de 60 %) ont obtenu un taux de fécondation satisfaisant, compris entre 50 et 75 %. Cependant, une proportion non négligeable de patientes (22,7 %) a présenté un taux de fécondation inférieur à 50 %, traduisant probablement des altérations liées à la qualité ovocytaire ou spermatique, dont la fragmentation de l'ADN spermatique pourrait être un facteur contributif (**Kim et al., 2019**).

L'analyse de la qualité embryonnaire a montré une prédominance des embryons de grade B, représentant 43% de la population. Les embryons de grade C étaient fréquents 21,7%, indiquant une qualité embryonnaire inférieure, alors que ceux de grade A, correspondant à une qualité optimale, ne représentaient que 17% de notre population. Ces résultats corroborent avec ceux de **Kim et al., (2019)**. D'un point de vue clinique, le taux de grossesse ayant poursuivi le parcours de PMA par ICSI est de 34,7%, ce taux peut être expliquer par la qualité moyenne des embryons (**Sivanarayana et al., 2013**).

Aucune association significative n'a été établie dans notre étude entre le DFI et le volume spermatique ou la morphologie des spermatozoïdes. Cependant, une tendance à la diminution de la vitalité avec l'augmentation du DFI a été observée, en accord avec les études de **Medina et al. (2013)**, suggérant une altération de la viabilité en présence d'une augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique (**Caliskan et al., 2022**) (**Zhang et al., 2023**).

L'âge ne semble pas influencer significativement le taux de fragmentation de l'ADN spermatique, que ce soit par corrélation linéaire ou par comparaison de groupes. Ce résultat concorde avec les résultats de l'étude menée par **Al-Darawsha et al. (2023)**, où aucune corrélation statistique n'a été constatée entre le DFI et l'âge (**p = 0,382**). Cependant certaines données de la littérature rapportent une augmentation du DFI avec l'âge, mais il pourrait s'expliquer par la taille limitée de notre échantillon. L'étude de **Sigman. (2020)** et de **Pino et al. (2020)**, mettent en évidence que l'augmentation de l'âge paternel est un facteur reconnu pour contribuer à l'augmentation du DFI, ce qui démontre l'impact du vieillissement cellulaire et du stress oxydatif sur les cellules germinales (**Wan et al., 2025**).

Dans l'étude de **Lu et al. (2018)** une corrélation négative significative a été mise en évidence entre la fragmentation de l'ADN spermatique et la mobilité progressive des spermatozoïdes ($r = -0,474$, $p < 0,001$), en utilisant la méthode SCSA. De manière concordante, nos résultats ont montré une corrélation inverse significative entre le DFI et la mobilité progressive, (**r = -0,57 ; p = 0,001**), confirmant ainsi l'impact significatif de la fragmentation de l'ADN spermatique (DFI) sur la fertilité masculine. Ces résultats confirment les données de la littérature, notamment celles de **Ribas-Maynou et al., (2022)** (**Yu et al., 2025**).

La corrélation de Spearman n'a pas montré de relation statistiquement significative entre la durée de l'infertilité et l'indice de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI), malgré une corrélation positive faible (**r = 0,30 ; p = 0,10**). Ces résultats suggèrent qu'il n'existe pas de relation claire entre la durée de l'infertilité et le taux de fragmentation de l'ADN dans notre population. Des résultats similaires ont été rapportés par **Le et al. (2019)**, qui n'ont pas trouvé d'association significative entre ces deux variables (**p = 0,985**).

Cependant, l'analyse comparative des catégories de DFI selon les moyennes de durée d'infertilité a révélé des différences statistiquement significatives (**p = 0,022**). Cette observation suggère que, bien que la relation ne soit pas strictement linéaire, les patients ayant une infertilité plus prolongée présentent des niveaux plus élevés de fragmentation de l'ADN spermatique (**Yang et al. 2019**). Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse selon laquelle une durée prolongée d'infertilité peut s'accompagner d'une dégradation progressive de la qualité spermatique, probablement liée à des facteurs chroniques tels que le stress oxydatif prolongé, des altérations spermatiques cumulatives ou une absence prolongée de traitement. Toutefois, des études avec un échantillon plus large sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Contrairement à certaines hypothèses biologiques, nos résultats n'ont pas mis en évidence de relation significative entre le volume de l'éjaculat et le taux de fragmentation de l'ADN

spermatique, avec un coefficient de corrélation très faible et non significatif ($r = -0,027$; $p = 0,88$) Ce résultat concorde avec les résultats de **Yu et al., (2025)**.

Bien que l'on ait observé un taux plus élevé d'hypospermie (20 %) dans le groupe DFI modéré (15–30 %), cette tendance n'a pas atteint le seuil de significativité, autrement dit il n'existe pas de lien clair entre la quantité de liquide séminal émis et l'intégrité du matériel génétique dans notre population. Ce résultat est confirmé par l'étude de **Liu et al. (2023)**, qui n'ont pas trouvé de lien significatif entre le volume séminal et le DFI ($p > 0,05$) dans un échantillon de 1462 patients infertiles.

Bien que certains auteurs aient suggéré une corrélation entre les anomalies morphologiques sévères et l'altération de la chromatine, nos résultats ne confirment pas cette association. Dans notre série, aucune relation significative n'a été trouvée entre la morphologie des spermatozoïdes et le taux de fragmentation de l'ADN. Que ce soit par le test du χ^2 ou par la comparaison des moyennes, les différences observées entre les groupes n'ont pas atteint le seuil de significativité (respectivement $p = 0,461$ et $p = 0,275$). Ces résultats sont concordants avec ceux d'une étude algérienne, qui n'a pas trouvé de corrélation significative entre la morphologie et le DFI ($r = 0,24$; $p > 0,05$) (**Boushaba & Belaaloui, 2015**).

Nos résultats n'ont pas montré d'association significative entre l'indice d'anomalies multiples (IAM) et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI), que ce soit en comparant les moyennes d'IAM ($p = 0,216$) ou en étudiant la répartition des patients selon les seuils d'IAM ou de DFI ($p = 0,155$). Ces résultats suggèrent que l'augmentation du DFI ne s'accompagne pas systématiquement d'une majoration des anomalies morphologiques. Concordant avec plusieurs études antérieures (**Ranzato et al., 2024**).

Tous nos patients présentaient une vitalité spermatique normale (≥ 54 %), selon les critères de l'OMS 2021. (**WHO,2021**) Bien qu'une diminution progressive de la moyenne de vitalité ait été observée avec l'augmentation du taux de fragmentation de l'ADN (DFI), passant de 79,06 % dans le groupe DFI < 15 %, à 74 % dans le groupe 15–30 %, et à 70 % dans le groupe DFI > 30 %, cette différence n'était pas statistiquement significative ($p = 0,183$).

Ces résultats suggèrent une tendance à la baisse de la vitalité chez les patients présentant une fragmentation plus élevée, bien que cette association ne soit pas suffisamment marquée pour être confirmée statistiquement dans notre échantillon. Plusieurs publications, dont **Yang et al. (2019)**, confirment une corrélation négative entre la vitalité spermatique et le taux de fragmentation de l'ADN, suggérant que des spermatozoïdes moins viables sont plus susceptibles de présenter des dommages génomiques.

Une association statistiquement significative a été mise en évidence entre le tabagisme et les classes de fragmentation de l'ADN spermatique ($p = 0,039$). Nous avons observé que 75 % des patients ayant un DFI > 30 % et 70 % de ceux ayant un DFI compris entre 15 % et 30 % étaient fumeurs. En revanche, 75 % des patients ayant un DFI < 15 % n'étaient pas fumeurs. Ces résultats suggèrent une tendance nette : le tabac semble associé à une augmentation du taux de

fragmentation de l'ADN spermatique. Comparativement, des résultats similaires ont été observés dans l'étude menée par **Le et al. (2019)**, où le tabagisme s'est avéré être un facteur associé à une augmentation du DFI dans cet échantillon (**p= 0,001**).

Une autre étude récente, menée par **Osadchuk et al. (2023)**, corrobore nos résultats en identifiant le tabagisme comme un facteur environnemental délétère influençant la fertilité masculine. Les auteurs ont démontré que les hommes fumeurs avaient un taux de DFI significativement plus élevé comparé aux non-fumeurs et une altération des paramètres spermatiques. Nos résultats renforcent donc l'idée que le tabac constitue un facteur de risque modifiable, dont la réduction ou l'arrêt devrait être systématiquement recommandé chez les hommes pris en charge pour infertilité.

Plusieurs études ont également rapporté une altération des paramètres spermatiques (concentration, mobilité, morphologie) chez les fumeurs, mais surtout une atteinte de l'intégrité génomique des gamètes masculins, impactant directement la fécondation, la qualité embryonnaire et les chances de grossesse (**Sharma et al., 2016**) (**Szabó et al., 2023**).

Nos résultats montrent une association statistiquement significative entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI) et la mobilité progressive des spermatozoïdes avec (**p = 0,004**). L'analyse du Chi² a révélé que la majorité des patients ayant un DFI compris entre 15 et 30 % présentent une mobilité altérée (<30 %), ce qui suggère que cette plage intermédiaire de fragmentation pourrait être particulièrement délétère pour la motilité spermatozoïdaire (**Belloc et al., 2014**) (**Liu et al., 2025**).

Nos données montrent une corrélation significative concernant le DFI et la qualité embryonnaire, (**p = 0,025**). L'analyse montre que tous les patients présentant une fragmentation élevée (DFI > 30 %) ont obtenu des embryons de grade C ou D, indiquant une altération du développement embryonnaire. Ce constat soutient l'hypothèse selon laquelle un ADN spermatique endommagé pourrait compromettre la compétence embryonnaire, probablement en perturbant les premières divisions cellulaires après la fécondation. Il est intéressant de noter que, bien qu'un DFI faible (<15 %) soit généralement considéré comme favorable, seule une minorité de ces patients (16,7 %) ont obtenu des embryons de grades A ou B (**Jiang et al., 2025**) (**Kim et al., 2019**).

Nos résultats, corroborés par **Khalafalla et al. (2021)**, suggèrent que l'évaluation de la qualité embryonnaire peut être insuffisante pour prédire le potentiel d'implantation et de développement à terme en cas de DFI élevée.

Les résultats de notre étude montrent une association statistiquement significative entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et le taux de fécondation obtenu après ponction ovocytaire. La totalité des patients ayant un DFI > 30 % ont présenté un taux de fécondation inférieur à 50%, ce qui suggère un impact délétère d'un DFI élevé sur la capacité fécondante des spermatozoïdes. (**Baldi et al., 2025**), (**Lourenço et al., 2023**).

En revanche, les patients avec un DFI modéré (15–30 %) ont obtenu de meilleurs taux de fécondation, avec une majorité comprise entre 50 % et 75 %, tandis que ceux avec un DFI faible ont montré une plus grande hétérogénéité. Ce résultat est en accord avec la littérature, qui souligne que la fragmentation de l'ADN spermatique peut altérer les étapes précoces de la fécondation,

probablement par des défauts de décondensation du noyau ou de signalisation post-fécondation. À noter que les performances de fécondation dépendent aussi de la qualité ovocytaire, et que dans notre série, une patiente n'a pas pu être incluse dans cette analyse en raison d'une ponction blanche (**Oehninger and Ombelet, 2019**) (**Zhang et al., 2013**).

Ces constats sont en accord avec ceux de **Baldi et al. (2025)**, qui mettent en avant que des DFI élevés sont systématiquement liés à une diminution de la qualité embryonnaire et à des échecs de fécondation lors des techniques de procréation médicalement assistée (PMA). D'après une étude menée par **Evenson et al. (2020)**, les hommes ayant un DFI $\geq 40\%$ ont un risque accru de fausse couche et un faible taux de succès en FIV/ICSI.

Bien que nos données suggèrent une tendance à une absence de grossesse chez les patients ayant un DFI $> 30\%$, cette différence n'atteint pas le seuil de significativité statistique avec (**p = 0,39**). Ce paramètre nécessite d'être explorée sur des cohortes plus larges pour confirmer ou infirmer cette association.

Lin & Levin. (2025), ont montré que la longueur ainsi que l'intégrité fonctionnelle des télomères spermatiques sont transmises au zygote, jouant un rôle important dans la stabilité chromosomique dès les premières divisions embryonnaire. Cette étude suggère que les dommages au niveau de l'ADN spermatique pourraient compromettre la qualité du génome et altérer la viabilité embryonnaire. La fragmentation élevée de l'ADN spermatique pourrait donc refléter non seulement des cassures mais également une fragilité télomérique, affectant la capacité du zygote à maintenir une division cellulaire normale.

Sur le plan clinique, un DFI élevé compromet les résultats de la FIV conventionnelle, induisant une baisse des taux d'implantation, de grossesse clinique et de naissance vivante, ainsi qu'une hausse de fausse couche précoce. Cependant il semble que ces effets délétères ne sont pas observés lors d'une fécondation par ICSI, laissant penser que cette technique atténue partiellement les effets négatifs associés à l'intégrité de l'ADN spermatique (**Zhang et al., 2023**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'infertilité masculine représente un enjeu majeur de santé reproductive, où l'évaluation conventionnelle du spermogramme peuvent parfois ne pas suffire à expliquer les échecs de la fécondation ou les anomalies embryonnaires. L'objectif de notre étude, était d'étudier le rôle de la fragmentation de l'ADN spermatique (DFI) et son influence sur les paramètres spermatique, ainsi que sur les résultats des techniques de procréation médicalement assistée (PMA).

Nos résultats indiquent qu'un taux élevé de fragmentation de l'ADN (>30 %) est associé à une altération significative de la mobilité progressive des spermatozoïdes, ainsi qu'à une diminution considérable de la qualité des embryons et du taux de fécondation. Cependant aucune corrélation significative n'a été décelée entre le DFI et les autres paramètres comme le volume spermatique, la vitalité, la concentration ou la morphologie normale. De plus, la consommation de tabac semble participer à l'augmentation du DFI, soulignant l'importance des habitudes de vie dans l'étiologie de l'altération de l'ADN spermatique.

Bien que nos résultats soient limités par la taille de l'échantillon, ils mettent en évidence la puissance prédictive du DFI et soutiennent son intégration systématique dans l'évaluation de l'infertilité, cela est particulièrement pertinent pour les couples en échec de PMA ou exposés à des risques environnementaux, dans le but d'initier des interventions ciblées (supplémentation en antioxydants, sevrage tabagique, traitement de varicocèle) avant d'envisager les techniques de reproduction assistée.

Concernant les perspectives, il serait judicieux d'élargir l'échantillon d'étude pour renforcer la puissance statistique des résultats. De plus un suivi longitudinal des couples en parcours de PMA permettrait d'évaluer avec plus de précision l'impact d'un taux élevé de fragmentation de l'ADN spermatique sur les taux de grossesse évolutive, de fausses couches et d'échecs d'implantation.

Intégrer d'autres méthodes d'analyse de la fragmentation, comme les tests TUNEL ou Comet, offrirait une meilleure compréhension des mécanismes impliqués et une comparaison de la sensibilité des divers outils diagnostiques.

Il est également indispensable d'évaluer l'impact à long terme de la fragmentation de l'ADN spermatique sur la santé des enfants conçus par PMA, certaines études suggèrent un risque accru de troubles du développement, de maladies métaboliques ou neurodégénératives chez les enfants nés de ces techniques, en particulier lorsqu'il existe des anomalies génétiques. Comparer ces enfants à ceux conçus de façon naturelle pourrait fournir des réponses sur la sûreté et les conséquences à long terme des techniques de PMA utilisant des gamètes altérés.

Finalement, l'évaluation de traitements antioxydants ou hormonaux ciblés pourrait aider à réduire le taux de fragmentation et optimiser les résultats cliniques. Il est important d'adopter les stratégies

de sélection des spermatozoïdes, en utilisant des techniques comme la sélection morphologique par IMSI (Intacytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection) ou la sélection physiologique par PICS (Physiological ICSI), afin d'optimiser le choix des spermatozoïdes ayant une intégrité génomique optimale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adler A, Roth B, (2023) Sperm DNA fragmentation testing in clinical management of reproductive medicine

Agarwal, A., Farkouh, A., Saleh, R., Abdel-Meguid Hamoda, T. A., Harraz, A. M., Kavoussi, P., Arafa, M., Salvio, G., Rambhatla, A., Toprak, T., Gül, M., Phuoc, N. H. V., Boitrelle, F., Birowo, P., Ghayda, R. A., Cannarella, R., Kuroda, S., Durairajanayagam, D., Zini, A., Wyns, C., ... Global Andrology Forum (2023). Controversy and Consensus on Indications for Sperm DNA Fragmentation Testing in Male Infertility: A Global Survey, Current Guidelines, and Expert Recommendations. *The world journal of men's health*, 41(3), 575–602. <https://doi.org/10.5534/wjmh.220282>

Agarwal, A., Majzoub, A., Baskaran, S., Panner Selvam, M. K., Cho, C. L., Henkel, R., Finelli, R., Leisegang, K., Sengupta, P., Barbarosie, C., Parekh, N., Alves, M. G., Ko, E., Arafa, M., Tadros, N., Ramasamy, R., Kavoussi, P., Ambar, R., Kuchakulla, M., Robert, K. A., ... Shah, R. (2020). Sperm DNA Fragmentation: A New Guideline for Clinicians. *The world journal of men's health*, 38(4), 412–471. <https://doi.org/10.5534/wjmh.200128>

Ahmadi, A., Sobhani, A., Khalili, M. A., Agha-Rahimi, A., Nabi, A., & Findikli, N. J. (2022). Comparison of the efficiency of magnetic-activated cell sorting (MACS) and physiological intracytoplasmic sperm injection (PICSI) for sperm selection in cases with unexplained infertility. *Journal of Reproduction & Infertility*, 23(3), 184–191.

Aktas, A., Serbes, G., Yigit, M. H., Aydın, N., Uzun, H., & İlhan, H. O. (2024). Hi-LabSpermMorpho: A Novel Expert-Labeled Dataset with Extensive Abnormality Classes for Deep Learning-Based Sperm Morphology Analysis. *IEEE Access*, 1. <https://doi.org/10.1109/access.2024.3521643>

Aladamat, N., & Tadi, P. (2021). *Histology, Leydig Cells*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556007/>

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26914/>

Al-Darawsha, T. Z., Dayioglu, N., Al-Azzawi, B. R., & Irez, T. (2023). Study a relationship between age, body mass index, and sperm parameters with sperm DNA fragmentation levels in Iraqi infertile patients. *Al-Ameed Journal for Medical Research and Health Sciences*, 1(2), 3.

Axelsson, J., Lindh, C. H., & Giwercman, A. (2022). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and nicotine, and associations with sperm DNA fragmentation. *Andrology*, 10(4), 740–748. <https://doi.org/10.1111/andr.13170>

- Bahri, H., Ben Khalifa, M., Ben Rhouma, M., Abidi, Z., Abbassi, E., Ben Rhouma, K., & Benkhalifa, M. (2021). Decline in semen quality of North African men: a retrospective study of 20,958 sperm analyses of men from different North African countries tested in Tunisia over a period of 6 years (2013-2018). *Annals of human biology*, 48(4), 350–359. <https://doi.org/10.1080/03014460.2021.1957501>
- Balder, P., Jones, C., Coward, K., & Yeste, M. (2024). Sperm chromatin: Evaluation, epigenetic signatures and relevance for embryo development and assisted reproductive technology outcomes. *European Journal of Cell Biology*, 103(3), 151429. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2024.151429>
- Baldi, E., Colpi, G. M., Huang, Z. W., Balagobi, B., Boitrelle, F., Shah, R., & Agarwal, A. (2025). High sperm DNA fragmentation - finding a needle in the haystack: tips on selecting the best sperm for ICSI and ART. *Asian journal of andrology*, 27(2), 139–143. <https://doi.org/10.4103/aja202451>
- Bartlett, Z., & Yang, J. (2017). Paternal Sperm Telomere Elongation and Its Impact on Offspring Fitness. <https://hdl.handle.net/10776/11402>
- Bastawros, H. (2023). *Human Reproduction: A Clinical Approach*. Iowa State University Digital Press. P48
- Belloc, S., Benkhalifa, M., Cohen-Bacrie, M., Dalleac, A., Chahine, H., Amar, E., & Zini, A. (2014). Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31(5), 527–532. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0194-3>
- Bhat, G. R., Lone, F. A., & Dalal, J. (2024). Microfluidics-A novel technique for high-quality sperm selection for greater ART outcomes. *FASEB bioAdvances*, 6(10), 406–423. <https://doi.org/10.1096/fba.2024-00041>
- Bhattacharya, I., Dey, S., & Banerjee, A. (2023). Revisiting the gonadotropic regulation of mammalian spermatogenesis: evolving lessons during the past decade. *Frontiers in Endocrinology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1110572>
- Björndahl, L., Kirkman Brown, J., & other Editorial Board Members of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (2022). The sixth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: ensuring quality and standardization in basic examination of human ejaculates. *Fertility and sterility*, 117(2), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.12.012>
- Blanchard, M., Haguenoer, K., Apert, A., Poret, H., Barthélémy, C., Royère, D., & Guérif, F. (2011). Sperm morphology assessment using David's classification: time to switch to strict criteria? Prospective comparative analysis in a selected IVF population. *International journal of andrology*, 34(2), 145–152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01066.x>

- Boursier, A., Dumont, A., Boitrelle, F., Prasivoravong, J., Lefebvre-Khalil, V., Robin, G., & Barbotin, A.-L. (2022). Necrozoospermia: The tree that hides the forest. *Andrology*, 10(4), 642–659. <https://doi.org/10.1111/andr.13172>
- Boushaba, S., & Belaaloui, G. (2015). Sperm DNA fragmentation and standard semen parameters in algerian infertile male partners. *The world journal of men's health*, 33(1), 1–7. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2015.33.1.1>
- Caliskan, Z., Kucukgergin, C., Aktan, G., Kadioglu, A., & Ozdemirler, G. (2022). Evaluation of sperm DNA fragmentation in male infertility. *Andrologia*, 54(11), e14587. <https://doi.org/10.1111/and.14587>
- Chandra, A., Varghese, A. C., Deepinder, F., & Jeat, A. W. (2010). Anatomy and physiology of male gametogenesis. In *Andrology Laboratory Manual* (1st ed., Chap. 1). Jaypee Brothers Medical Publishers. https://doi.org/10.5005/jp/books/11172_1
- Chen, D., Sun, N., Hou, L., Kim, R., Faith, J., Aslanyan, M., Tao, Y., Zheng, Y., Fu, J., Liu, W., Kellis, M., & Clark, A. (2019). Human Primordial Germ Cells Are Specified from Lineage-Primed Progenitors. *Cell reports*, 29(13), 4568–4582.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.083>
- Dai, C., Zhang, Z., Shan, G., Chu, L.-T., Huang, Z., Moskovtsev, S., ... Sun, Y. (2021). *Advances in sperm analysis: techniques, discoveries and applications*. *Nature Reviews Urology*, 18(8), 447–467. doi:10.1038/s41585-021-00472-2
- De Vos, A., Van de Velde, H., Bocken, G., Eylenbosch, G., Franceus, N., Meersdom, G., Tistaert, S., Vankelecom, A., Tournaye, H., & Verheyen, G. (2013). Does intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improve embryo development? A randomized sibling-oocyte study. *Human reproduction* (Oxford, England), 28(3), 617–626. <https://doi.org/10.1093/humrep/des435>
- Dunn, A., Maloney, T., Villaruel, E., Watson, N., Pane, M., Hawksworth, D., & Spitzer, T. (2025). Semen Parameters and Exposure Risks in Military Males. *Military medicine*, usaf305. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/milmed/usaf305>
- Dutta, S., Bocu, K., & Agarwal, A. (2024). Role of Leukocytospermia in the Management of Male Infertility: Decoding a Mystery for the Busy Clinicians. *The world journal of men's health*, 10.5534/wjmh.240152. Advance online publication. <https://doi.org/10.5534/wjmh.240152>
- Encyclopaedia Britannica. (2024) Spermatogenesis. Encyclopaedia Britannica Inc. .
- Esteves, S. C., Miyaoka, R., & Agarwal, A. (2011). An update on the clinical assessment of the infertile male. [corrected]. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 66(4), 691–700. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322011000400026>
- Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P., Gosálvez, J., Lewis, S. E. M., Sharma, R., & Humaidan, P. (2021). Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*, 53(2), e13874. <https://doi.org/10.1111/and.13874>

- Evenson D. P. (2022). Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) for Fertility Assessment. *Current protocols*, 2(8), e508. <https://doi.org/10.1002/cpz1.508>
- Evenson, D. P., Djira, G., Kasperson, K., & Christianson, J. (2020). Relationships between the age of 25,445 men attending infertility clinics and sperm chromatin structure assay (SCSA®) defined sperm DNA and chromatin integrity. *Fertility and Sterility*, 114(2), 311–320.
- Faix, A., Methorst, C., Lamazou, F., Vialard, F., & Huyghe, E. (2023). Évaluation de l'homme du couple infertile [Assessment of the man in the infertile couple]. *Progres en urologie : journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie*, 33(13), 588–612. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2023.09.027>
- Fawzy, F., Hussein, A., Eid, M. M., El Kashash, A. M., & Salem, H. K. (2015). Cryptorchidism and Fertility. *Clinical medicine insights. Reproductive health*, 9, 39–43. <https://doi.org/10.4137/CMRH.S25056>
- Fernández de la Puente, M., Salas-Huetos, A., Valle-Hita, C., Babio, N., Murphy, M., Canudas, S., & Salas-Salvadó, J. (2023). Is telomere length a biomarker of sperm quality? A systematic review and meta-analysis of observational studies. *International Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.1111/andr.13482>
- Franco, G., Franco, A., Proietti, F. (2023). Therapy in Secretory and Obstructive Azoospermia. In: Bettocchi, C., Busetto, G.M., Carrieri, G., Cormio, L. (eds) Practical Clinical Andrology. (pp 199–212). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-11701-5_15
- Gajski, G., Ravlić, S., Godschalk, R., Collins, A., Dusinska, M., & Brunborg, G. (2021). Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage in mature sperm. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 788, 108398. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108398>
- Gawecka, J. E., Boaz, S., Kasperson, K., Nguyen, H., Evenson, D. P., & Ward, W. S. (2015). Luminal fluid of epididymis and vas deferens contributes to sperm chromatin fragmentation. *Human reproduction (Oxford, England)*, 30(12), 2725–2736. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev245>
- Gonzalez, D. C., Ory, J., Blachman-Braun, R., Nackeeran, S., Best, J. C., & Ramasamy, R. (2022). Advanced Paternal Age and Sperm DNA Fragmentation: A Systematic Review. *The world journal of men's health*, 40(1), 104–115. <https://doi.org/10.5534/wjmh.200195>
- Griswold M. D. (2018). 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biology of reproduction*, 99(1), 87–100. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox027>
- Guo, Y., Dong, Y., Zheng, R., Yan, J., Li, W., Xu, Y., Yan, X., Ke, Y., Li, Y., & Xiang, L. (2024). Correlation between viral infections in male semen and infertility: a literature review. *Virology journal*, 21(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02431-w>

- Hall, J. E. (2020). *Guyton and Hall textbook of medical physiology* (14th ed.). Elsevier.
- Hartanto, M. C., Pakpahan, C., & Utomo, A. T. (2024). Hyperspermia, the often-neglected semen abnormality affecting fecundability. *Majalah Biomorfologi*, 34(1), 60–66. <https://doi.org/10.20473/mbiom.v34i1.2024.60-66>
- Hashimoto, S., & Kanematsu, T. (2000). *In Situ Nick Translation* (pp. 13–18). Springer, Tokyo. https://doi.org/10.1007/978-4-431-67915-8_2
- Huyghe, E., Methorst, C., & Faix, A. (2023). Varicocèle et infertilité masculine. *Progres En Urologie*. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2023.09.003>
- Ishiguro K. I. (2024). Mechanisms of meiosis initiation and meiotic prophase progression during spermatogenesis. *Molecular aspects of medicine*, 97, 101282. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2024.101282>
- Jiang, H., Xia, X., Luo, Y., Pan, H., Qu, S., & Xu, J. (2025). Sperm DNA fragmentation index: limited effectiveness on predicting embryo quality in assisted reproduction technology treatments. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 23(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12958-025-01345-8>
- Kandil, H., & Henkel, R. R. (2025). *Male infertility: Management of infertile men in reproductive medicine* (Chap. 9, pp. 104–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-93047-5.00018-0>
- Keith L. Moore and T.V.N. Persaud "Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects" 2019
- Khalafalla, K., Majzoub, A., Elbardisi, H., Bhathella, A., Chaudhari, A., Agarwal, A., Henkel, R., AlMarzooki, T., Burjaq, H., & Arafa, M. (2021). The effect of sperm DNA fragmentation on intracytoplasmic sperm injection outcome. *Andrologia*, 53(10), e14180. <https://doi.org/10.1111/and.1418>
- Kim, S. M., Kim, S. K., Jee, B. C., & Kim, S. H. (2019). Effect of Sperm DNA Fragmentation on Embryo Quality in Normal Responder Women in In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Yonsei medical journal*, 60(5), 461–466. <https://doi.org/10.3349/ymj.2019.60.5.461>
- Krausz, C., Farnetani, G. (2023). Clinical Interpretation of Semen Analysis. In: Bettocchi, C., Busetto, G.M., Carrieri, G., Cormio, L. (eds) *Practical Clinical Andrology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-11701-5_13
- Le MT, Nguyen TTT, Nguyen TT, Van Nguyen T, Nguyen TAT, Nguyen QHV, et al. Does conventional freezing affect sperm DNA fragmentation? *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 2019;46(2):67-75. DOI: 10.5653/cerm.2019.46.2.67

- Le, M. T., Nguyen, T. A. T., Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, V. T., Le, D. D., Nguyen, V. Q. H., & Cao, N. T. (2019). Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters?. *Reproductive medicine and biology*, 18(4), 390–396. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12297>
- Leslie SW, Soon-Sutton TL, Khan MAB. Male Infertility. [Updated 2024 Feb 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562258/>
- Li, J., Luo, L., Diao, J., Li, Y., Zhang, S., Chen, L., Yang, T., & Qin, J. (2021). Male sperm quality and risk of recurrent spontaneous abortion in Chinese couples: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 100(10), e24828. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000024828>
- Li, L., Lin, W. C., Wang, Z., Huang, R., Xia, H., Li, Z., Deng, J., Tao, Y., Huang, Y., & Yang, Y. (2024). Hormone Regulation in Testicular Development and Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 5805. <https://doi.org/10.3390/ijms25115805>
- Lin, S. Y., & Levine, M. T. (2025). Paternal effects on telomere integrity during the sperm-to-embryo transition. *Current opinion in genetics & development*, 93, 102348. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2025.102348>
- Liu, K., Yajunchen, Wang, X., Zhao, M., Wu, S., & An, R. (2025). Detection of sperm DNA damage in male infertility patients and evaluation of Levocarnitine efficacy using sperm chromatin diffusion (SCD) and AI-DFI methods: a cross-sectional study. *European journal of medical research*, 30(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s40001-025-02480-z>
- Lourenço, M. L., Moura, G. A., Rocha, Y. M., Rodrigues, J. P. V., & Monteiro, P. B. (2023). Impact of sperm DNA fragmentation on the clinical outcome of assisted reproduction techniques: a systematic review of the last five years. *JBRA assisted reproduction*, 27(2), 282–291. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20220057>
- 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 : RB&E*, 16(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0345-y>
- Lui, W. Y., & Cheng, C. Y. (2009). Transcription regulation in spermatogenesis. In C. Y. Cheng (Ed.), *Molecular mechanisms in spermatogenesis* (Vol. 636, pp. 141–167). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_7
- Maroto, M., Torvisco, S. N., García-Merino, C., Fernández-González, R., & Pericuesta, E. (2025). Mechanisms of Hormonal, Genetic, and Temperature Regulation of Germ Cell Proliferation, Differentiation, and Death During Spermatogenesis. *Biomolecules*, 15(4), 500. <https://doi.org/10.3390/biom15040500>

- Matteo, M. (2023). Assisted Reproductive Technology. In: Bettocchi, C., Busetto, G.M., Carrieri, G., Cormio, L. (eds) Practical Clinical Andrology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-11701-5_18
- Mayerhofer A. (2020). Peritubular cells of the human testis: prostaglandin E₂ and more. *Andrology*, 8(4), 898–902. <https://doi.org/10.1111/andr.12669>
- Miyata, H., Shimada, K., Kaneda, Y., & Ikawa, M. (2024). Development of functional spermatozoa in mammalian spermiogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 151(14), dev202838. <https://doi.org/10.1242/dev.202838>
- Morrison, C. D., & Brannigan, R. E. (2015). Metabolic syndrome and infertility in men. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 29(4), 507–515. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.10.006>
- Muro, S., Suriyut, J., & Akita, K. (2021). Anatomy of Cowper's gland in humans suggesting a secretion and emission mechanism facilitated by cooperation of striated and smooth muscles. *Scientific Reports*, 11(1), 16705.
- Nef, S., Stévant, I., & Greenfield, A. (2019). Characterizing the bipotential mammalian gonad. *Current topics in developmental biology*, 134, 167–194. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.01.002>
- O'Donnell L. (2015). Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis*, 4(2), e979623. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979623>
- Oehninger, S., & Ombelet, W. (2019). Limits of current male fertility testing. *Fertility and sterility*, 111(5), 835–841. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.005>
- Oliva R. (2006). Protamines and male infertility. *Human reproduction update*, 12(4), 417–435. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>
- Osadchuk, L. V., & Osadchuk, A. V. (2023). Individual Lifestyle and Male Fertility. *Fiziologîa človeka*, 49(2), 123-136. doi: [10.31857/S0131164622600690](https://doi.org/10.31857/S0131164622600690)
- Öztekin, Ü., Caniklioglu, M., Sarı, S., Selmi, V., Gürel, A., & Işı kay, L. (2019). Evaluation of Male Infertility Prevalence with Clinical Outcomes in Middle Anatolian Region. *Cureus*, 11(7), e5122. <https://doi.org/10.7759/cureus.5122>
- Pandit, R. K., & Pandey, S. (2024). An Evidence-Based Case Series of Male Infertility (OAT Syndrome Associated with Hypospermia) Treated with Constitutional Medicine. Homoeopathic Links. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1764342>
- Pino, V., Sanz, A., Valdés, N., Crosby, J., & Mackenna, A. (2020). The effects of aging on semen parameters and sperm DNA fragmentation. *JBRA assisted reproduction*, 24(1), 82–86. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20190058>

- Planinić, A., Marić, T., Bojanac, A. K., & Ježek, D. (2022). Reinke crystals: Hallmarks of adult Leydig cells in humans. *Andrology*, 10(6), 1107–1120. <https://doi.org/10.1111/andr.13201>
- Puerta Suárez, J., Villegas Castaño, A., Serna Quintana, G. J., Martínez, A., Romero Palacio, J., Giraldo, M., Cadavid, A. P., & Cardona Maya, W. (2015). Espermocultivo: crecimiento bacteriano del eyaculado y su relación con los parámetros seminales. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 80(1), 33–40. <https://doi.org/10.4067/S0717-75262015000100005>
- Rajfer J. (2008). When is azoospermia not azoospermia? *Reviews in urology*, 10(2), 169–170.
- Ranzato, T. S. G. A., Mello, M. D., Souza, P. F. C., Farias, L. B., Junior, Araujo, L. F. B., & Penna, I. A. A. (2024). The correlation between abnormal Krüger strict morphology and the sperm DNA fragmentation index. *JBRA assisted reproduction*, 28(4), 618–623. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20240068>
- Raperport, C., Desai, J., Qureshi, D., Rustin, E., Balaji, A., Chronopoulou, E., Homburg, R., Khan, K. S., & Bhide, P. (2024). The definition of unexplained infertility: A systematic review. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 131(7), 880–897. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.17697>
- Rey, R., Josso, N., & Racine, C. (2020). Sexual Differentiation. In K. R. Feingold (Eds.) et. al., *Endotext*. MDText.com, Inc.
- Ribas-Maynou, J., Novo, S., Torres, M., Salas-Huetos, A., Rovira, S., Antich, M., & Yeste, M. (2022). Sperm DNA integrity does play a crucial role for embryo development after ICSI, notably when good-quality oocytes from young donors are used. *Biological research*, 55(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s40659-022-00409-y>
- Scribner, R. T., & Tadros, N. N. (2021). Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System. In A. Agarwal, A. Majzoub, & S. C. Esteves (Eds.), *Manual of Sperm Retrieval and Preparation in Human Assisted Reproduction* (pp. 1–8). chapter, Cambridge: Cambridge University Press.
- Shalet S. M. (2009). Normal testicular function and spermatogenesis. *Pediatric blood & cancer*, 53(2), 285–288. <https://doi.org/10.1002/pbc.22000>
- Sharma, R., Harlev, A., Agarwal, A., & Esteves, S. C. (2016). Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *European urology*, 70(4), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.04.010>
- Sigman M. (2020). Significance of sperm DNA fragmentation and paternal age. *Fertility and sterility*, 114(2), 262. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.05.011>

- Singh, A., & Agarwal, A. (2011). The role of sperm chromatin integrity and DNA damage on male infertility. *The Open Reproductive Science Journal*, 3(1), 65–71. <https://doi.org/10.2174/1874255601103010065>
- Sivanarayana, T., Ravi Krishna, C., Jaya Prakash, G., Krishna, K. M., Madan, K., Sudhakar, G., & Rama Raju, G. A. (2013). Sperm DNA fragmentation assay by sperm chromatin dispersion (SCD): correlation between DNA fragmentation and outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Reproductive medicine and biology*, 13(2), 87–94. <https://doi.org/10.1007/s12522-013-0168-7>
- Smiti, Y. (2016). Les anomalies de différenciation sexuelle chez l'enfant Etude descriptive et analytique (A propos de 79 cas). DOI:[10.13140/RG.2.2.13656.11526](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13656.11526)
- Standring, S. (2020). *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice* (42nd ed.). Elsevier.
- Stavros S, Potiris A, (2024) Sperm DNA Fragmentation: Unraveling Its Imperative Impact on Male Infertility Based on Recent Evidence
- Stevens A, Lowe J (2003). *Histologie Humaine*. Elsevier. Pages 427-447
- Sullivan, R., Legare, C., Lamontagne-Proulx, J., Breton, S., and Soulet, D. (2019). Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology* 7 (5), 748–757. doi:10.1111/andr.12633
- Szabó, A., Váncsa, S., Hegyi, P., Váradi, A., Forintos, A., Filipov, T., Ács, J., Ács, N., Szarvas, T., Nyirády, P., & Kopa, Z. (2023). Lifestyle-, environmental-, and additional health factors associated with an increased sperm DNA fragmentation: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 21(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12958-023-01054-0>
- Timmermans, A., Vázquez, R., Otero, F., et al., 2022. Antibiotic toxicity on human spermatozoa assessed using the sperm DNA fragmentation dynamic assay. *Andrologia* 54, e14328. <https://doi.org/10.1111/and.14328>.
- Tiptiri-Kourpeti, A., Asimakopoulos, B., & Nikolettos, N. (2025). A Narrative Review on the Sperm Selection Methods in Assisted Reproductive Technology: Out with the New, the Old Is Better? *Journal of Clinical Medicine*, 14(4), 1066. <https://doi.org/10.3390/jcm14041066>
- Titi-Lartey, O. A., & Khan, Y. S. (2023). Embryology, Testicle. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Tiwana, M. S., & Leslie, S. W. (2023). Anatomy, Abdomen and Pelvis: Testes. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Umoh, E. (2024). Spermatogenesis. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.1007771
- Vashisht, A., & Gahlay, G. K. (2024). Understanding seminal plasma in male infertility: Emerging markers and their implications. *Andrology*, 12(3), 1058-1077.

- Virecoulon, F., Fruchart-Flamenbaum, A., Wallet, F., Defossez, A., Peers, M. C., & Mitchell, V. (2001). Spermoculture chez l'homme asymptomatique: à propos de 250 cas. *Andrologie*, 11(2), 49–55. <https://doi.org/10.1007/BF03034394>
- Wan, X. J., Huang, M., Yu, M., Ding, T., Huang, Z., Zhang, Z., Wu, X., & Tan, J. (2025). Correlation of the sperm DNA fragmentation index with semen parameters and its impact on fresh embryo transfer outcomes-a retrospective study. *PeerJ*, 13, e19451. <https://doi.org/10.7717/peerj.19451>
- Wang, C., & Swerdloff, R. S. (2014). Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertility and sterility*, 102(6), 1502–1507. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.10.021>
- Wang, J., Wang, W., Shen, L., Zheng, A., Meng, Q., Li, H., & Yang, S. (2022). Clinical detection, diagnosis and treatment of morphological abnormalities of sperm flagella: A review of literature. *Frontiers in genetics*, 13, 1034951. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1034951>
- World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/44261>
- World Health Organization. (2021). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6th ed. World Health Organization.
- Xie, D., Klopukh, B., Nehrenz, G. M., & Gheiler, E. L. (2017). *Aspermia: A Review of Etiology and Treatment*. 3(1). <https://doi.org/10.23937/2469-5742/1510023>
- Yang, H., Li, G., Jin, H., Guo, Y., & Sun, Y. (2019). The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle. *Translational andrology and urology*, 8(4), 356–365. <https://doi.org/10.21037/tau.2019.06.22>
- Young, J. (2016). *Infertilité masculine : mécanismes, causes et exploration*. Revue du Praticien, 80(8)
- Yu, H., Shi, C., Zhan, C., Wang, C., & Chen, J. (2025). Association of sperm DNA fragmentation with higher miscarriage rates in non-male factor infertility reproductive cycles. *Translational andrology and urology*, 14(5), 1456–1465. <https://doi.org/10.21037/tau-2025-322>
- Zahid, N., Tariq, U., Tahir, M., Hussain, S.S., & Rehman, R. (2020). DETERMINE DNA FRAGMENTATION IN NORMOSPERMIC AND OLIGOSPERMIC SAMPLES: A PILOT STUDY.
- Zhang, J., Cai, Z., Ma, C., Xiong, J., & Li, H. (2020). Impacts of Outdoor Air Pollution on Human Semen Quality: A Meta-Analysis and Systematic Review. *BioMed research international*, 2020, 7528901. <https://doi.org/10.1155/2020/7528901>

Zhang, N., Hao, C. F., Zhuang, L. L., Liu, X. Y., Gu, H. F., Liu, S., & Chen, Z. J. (2013). Prediction of IVF/ICSI outcome based on the follicular output rate. *Reproductive biomedicine online*, 27(2), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.04.012>

Zhang, W., & Wu, F. (2023). Effects of adverse fertility-related factors on mitochondrial DNA in the oocyte: a comprehensive review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 21(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12958-023-01078-6>

Zhang, X., Chao, S., Ye, N., & Ouyang, D. (2024). Emerging trends in sperm selection: enhancing success rates in assisted reproduction. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 22(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12958-024-01239-1>

Zhu, J., Arsovska, B., & Козовска, К. (2023). Case report - Acupuncture treatment for Asterozoospermia. *Deleted Journal*, 1(2), 14–18. <https://doi.org/10.59710/oaijoaru2312014z>

Sites web

(Auteur anonyme) : <https://histologie.univ-nantes.fr/?p=1502>

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des matériels et réactifs utilisés

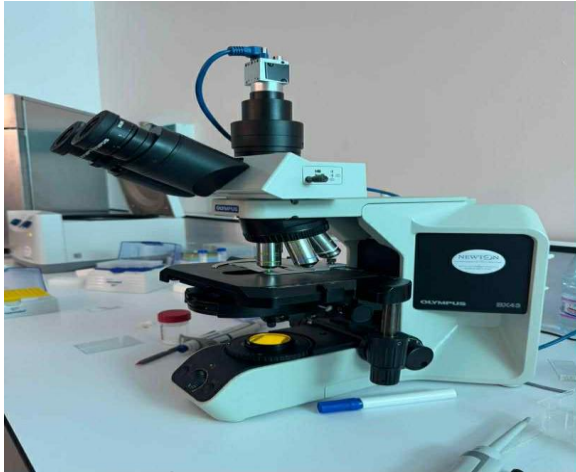


Figure 32: Microscope optique



Figure 31: Papier pH

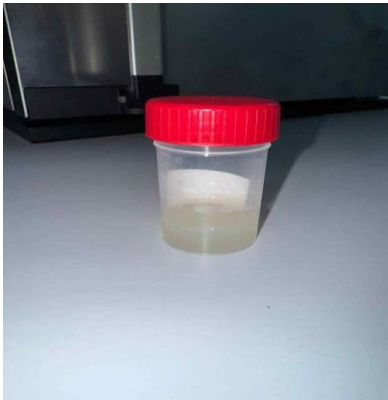


Figure 36: Pot de recueil.



Figure 35: Etuve

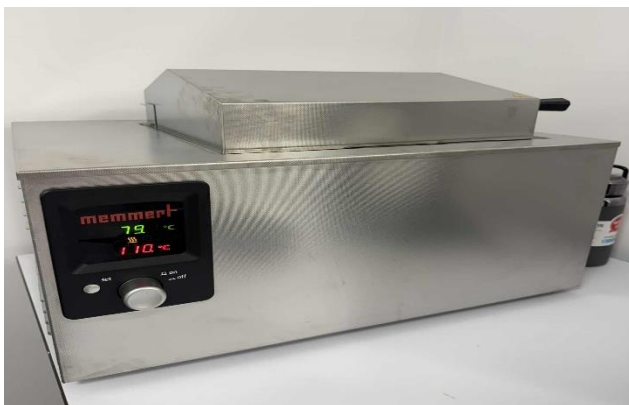


Figure 34: Bain marie



Figure 33: Colorant l'éosine et nigrosine



Figure 37: KIT halosperm G2 commercialisé par halotech



Figure 39: Kit Ral 555 (Spermoscan)



Figure 38: Kit Sil Select Plus

Annexe 2 : Fiche d'interrogatoire clinique

HÔPITAL MILITAIRE DE LA MÈRE ET DE L'ENFANT - CHÉRAGA (ALGER)	
CONSULTATION DU COUPLE INFERTILE	
UNITÉ : laboratoire de biologie de la reproduction	SERVICE : PROCRÉATION MÉDICALEMENT ASSISTÉE (PMA)
Fiche d'Interrogation Clinique	

I. IDENTITÉ DU COUPLE	
Nom & Prénom de l'homme : _____	Nom & Prénom de la femme : _____
Âge : _____ Profession : _____	Âge : _____ Profession : _____
Téléphone : _____	Téléphone : _____
Adresse : _____	
Cohabitation / mariage : _____ ans. Consanguinité : ☐ Oui ☐ Non → Si Oui, lien de parenté : _____	

II. MOTIF DE CONSULTATION	
☐ Infertilité primaire ☐ Infertilité secondaire ☐ Autre : _____ Durée d'infertilité : _____ ans	

III. ANTÉCÉDENTS MÉDICAUX ET CHIRURGICAUX	
Chez l'homme : ☐ Pathologies andrologiques connues ☐ Chirurgies (varicocèle, hernie...) : _____ ☐ Infections uro-génitales ☐ Tabac / Alcool / Drogues ☐ Traitements antérieurs ou en cours : _____ ☐ Profession à risque / Exposition toxique	Chez la femme : ☐ Cycles irréguliers ☐ Douleurs pelviennes ☐ Syndrome des ovaires polykystiques ☐ Chirurgies (césarienne, curetage...) : _____ ☐ Maladies endocriniennes (thyroïde, diabète...) ☐ Traitements hormonaux : _____

IV. ANTÉCÉDENTS OBSTÉTRICAUX (FEMME)	
Nombre total de grossesses : _____	
Fausses couches : _____	Accouchements : _____
Grossesses Extra-Utérines (GEU) : _____	
Méthodes de contraception utilisées : _____	

V. EXAMENS PARACLINIQUES ANTÉRIEURS	
Spermogramme / Spermocytogramme / spermoculture : ☐ Oui ☐ Non → Résultats : _____	
Bilan hormonal féminin (FSH, LH, AMH, PRL, TSH, etc.) : → Date : _____ Résultats : _____	
Échographie pelvienne : → Résultat : _____	
Hystérosalpingographie : → Résultat : _____	
Autres examens (sérologies, caryotype, fragmentation ADN, etc.) : → Résultats : _____	

VI. ORIENTATION & CONCLUSION

Hypothèse diagnostique : _____

Décision thérapeutique : _____

☐ Induction de l'ovulation ☐ Insémination Intra-Utérine (IIU) ☐ FIV classique ☐ ICSI

☐ Autres : _____

Examens à compléter : _____

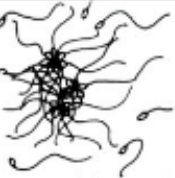
Médecin:

____ / ____ / ____ Signature: _____ Date: _____

Annexe 3 : Les normes du spermogramme – spermocytogramme selon l’OMS 2021

Paramètres	Seuil de références
Volume	1,4 ml
Concentration	16 Millions/ml
Numération dans l'éjaculat	39 Millions/éjaculat
Mobilité totale (a+b+c)	42 %
Mobilité progressive (a+b)	30 %
Vitalité	54 %
Formes typiques	4 % (selon Krüger)

Annexe 4 : Degrés d'agglutination des spermatozoïdes (selon l’OMS, 6^e éd.)

Parties impliquées	Degree of agglutination			
	Isolée (< 10 spz/agglutinat, beaucoup de spermatozoïdes libres)	Modérée (10–50 spz/agglutinat, spermatozoïdes libres)	Importante (> 50 spz/agglutinat, quelques spermatozoïdes encore libres)	Massive (tous les spz agglutinés et les agglutinats interconnectés)
A. Tête à tête				
B. Queue à queue (Les têtes sont libres et se déplacent indépendamment des queues agglutinées).				
C. Extrémité de queue à extrémité de queue				
D. Mixte (Présence simultanée d'agglutinations tête à tête et queue à queue.				
E. Enchevêtrement (Les têtes et les queues sont emmêlées. Les têtes ne sont pas clairement visibles comme dans une agglutination queue à queue)				

Annexe 5 : Classification des résultats du test de dispersion de la chromatine des spermatozoïdes

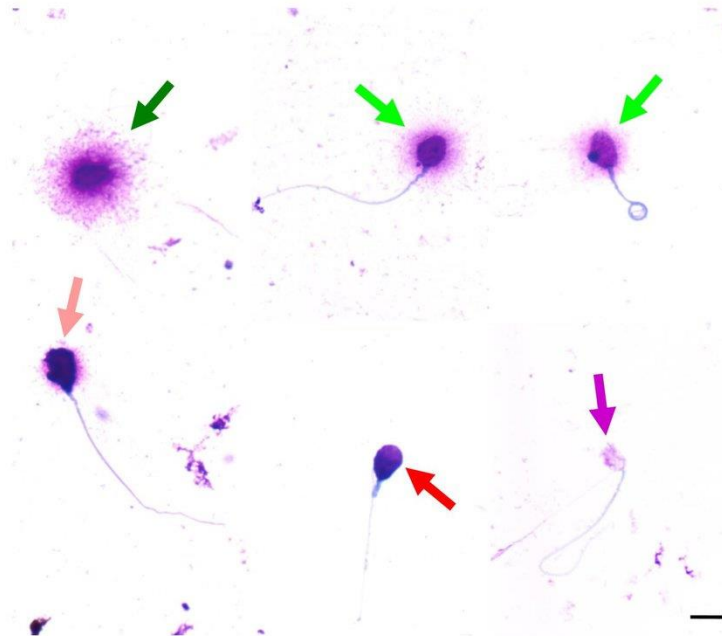


Figure 40: Halo large (flèche vert foncé) et halo moyen (flèches vert clair) : Spermatozoïdes sans fragmentation de l'ADN spermatique,

Petit halo (flèche rose) et pas de halo (flèche rouge). Spermatozoïdes avec ADN spermatique fragmenté : Spermatozoïdes avec ADN dégradé (flèche violette).

Annexe 6 : Fiche de résultat du spermogramme



Référence 2288
 Date (jour/mois/an) 06/11/2024
 Centre Laboratory
 CHN 1327
 Patient

Référence
 CHN

Date de prélèvement	06/11/2024 10:00	Méthode de prélèvement	at laboratory
Volume (ml)	3,00	pH	9,00
Température (°C)	37	Jours d'abstinence	3
Difficultés pendant le pré	No	Echantillon complet	Complete
Liquéfaction	<60 min	Agrégation	None
Viscosité	Normal	Agglutination	None
Apparence	Normal	Eléments cellulaires	Abnormal
Traitement			

Diagnostic

Oligoasthénotérazoospermie

Concentration

Frais (13/11/2024 13:47)

12,00 Millions / ml
 (≥16,00Millions / ml)

36,00 M/Echantillon
 (≥39,00M/Echantillon)

Volume (ml): 3,00

Dilution 1 : 0

OMS 5

	Total	%	
Progressif (PR)	1500	15,00	(≥30,00%)
Non-progressif (NP)	1 000	10,00	
Immobile	7 500	75,00	

	Total	%	
Motile	2500	25,00	(≥42,00%)

OMS 6

	Total	%
Progressif rapide (type A)	0	0,00
Progressif moyen (type B)	1 500	15,00
Non progressif (type C)	1 000	10,00
Immobile (type D)	7 500	75,00

Référence: 2288

CHN: 1327

Patient: _

Date (jour/mois/année):



Centre: Laboratory

Morphologie

(13/11/2024 13:47)

	Total	%	
Normal	300	3,00	(≥4,00%)
Anomal	9 700	97,00	

Index de tératozoospermie

Index de déformation

Index d'anomalies multiples

Classification basique

	Total	%
Normal	300	3,00
Défauts de la tête	11 700	117,00
Défauts de la pièce intermédiaire	1 400	14,00
Défauts du flagelle	1 100	11,00
Reste cytoplasmique	500	5,00

Vitalité

(13/11/2024 13:47)

	Total	%	
Vivant	5 400	54,00	(≥54,00%)
Morts	4 600	46,00	

Commentaires

Vitalité

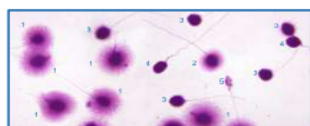
Commentaires

Présence de cellules rondes à un taux de : 11.2 M/mL.

Technicien

Administrator

Annexe 7 : fiche technique du kit Halosperm G2 by Halotech



Sperm classification

Count a minimum of 300 sperm per sample, according to the following criteria:

- Spermatozoa without DNA fragmentation:
 - Spermatozoa with big halo: those whose halo width is similar or larger than the diameter of the core (Fig. 1).
 - Spermatozoa with medium-sized halo: their halo size is between those with large and with very small halo (Fig. 2).
- "Others": cell nuclei which do not correspond to spermatozoa. One of the morphological characteristics which distinguish them is the absence of tail. These cells must not be included in the estimation of the frequency of sperm with fragmented DNA.
- Spermatozoa with fragmented DNA:
 - Spermatozoa with small halo: the halo width is similar or smaller than 1/3 of the diameter of the core (Fig. 3).
 - Spermatozoa without halo: (Fig. 4).
 - Spermatozoa without halo and degraded: those that show no halo and present a core irregularly or weakly stained (Fig. 5).

Positive control

Positive control: all the sperm cells are shown with halo with the exception of degraded spermatozoa. Follow the instruction for use, skipping step 7.

Warnings, environment and precautions

All patient samples and reagents should be treated as potentially infectious and the user must wear protective gloves, eye protection and laboratory coats when performing the test.

Care should be taken to avoid contact with skin or eyes, and to prevent inhalation. The acid solution (DA) contains Hydrochloric acid, and the lysis solution (LS) contains Dithiothreitol and ECOSURF™. Work under air removal environment and follow the manufacturer's Material Safety Data regarding safe handling.

The test should be discarded in a proper biohazard container after testing. Do not dump into sewers or waterways. Do not release the products used into the environment. Please follow the specific safety regulation of your laboratory facility with respect to chemicals storage and toxic products disposal as well as the exposure to them.

Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and kit reagents are handled.

Do not use beyond the expiration date, which appears on the package label.

Material Safety Data Sheet is available on request.

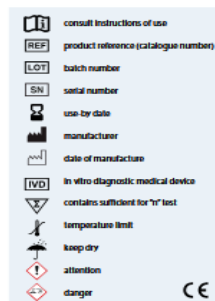
Store conditions

After receiving the kit, store it between 2 - 8 °C. Expiry date is on label.
After opening, the kit is stable for 9 months.

halosperm® is a trademark by halotech DNA, S.L.
C/ PARADAY 7, 1ª PLANTA CAJAPUS DE SANTOBLANCO - 28042 (MADRID) SPAIN
Tel: + 34 91 270 09 60 / www.halotechdna.com / info@halotechdna.com



halosperm® G2
Kit REF HT - HSG2
for 10 determinations



halosperm® G2 has been developed by Halotech DNA in response to the needs of users of the SCD test (Sperm Chromatin Dispersion test) for assessing sperm DNA fragmentation in human.
IVD for professional use only.

Principle of the method

Intact unfixed sperm (fresh, frozen/thawed, diluted samples) are immersed in an inert agarose microgel on a pretreated slide. An initial acid treatment denatures DNA in those sperm cells with fragmented DNA. Following this, the lysis solution removes most of the nuclear proteins. When massive DNA breakage is present, nucleoids from sperm with fragmented DNA do not show a dispersion halo or the halo is minimal. This test is an aid in the diagnosis. Interpretation of the results will be under medical criteria.

Performance characteristics

Sensitivity	93.0 %
Specificity	93.0 %
Repeatability	93.4 %
Reproducibility	94.0 %
Trueness	91.6 %
Accuracy	97.1 %
Interferent substances	-
Cut-off value ⁽¹⁾	IUI: SDF ≤ 20 %; IVF/ICSI: SDF ≤ 25 %

(1) Esteves BC et al., Andrologia 2021 53(2):e13874. doi: 10.1111/and.13874.

Description of kit components

Every kit contains the necessary to perform 10 assays. The components are:

- (ACS) Agarose Cell Support; 1 screw tube
- (SCS) Super-Coated Slides; 10 units
- (ET) Eppendorf Tubes; 10 units
- Solution 1(DA) Denaturant Agent, 10 ml
- Solution 2 (LS) Lysis Solution, 10 ml
- Solution 3 (SSA) eosine Staining Solution A, 10 ml
- Solution 4 (SSB) thiazine Staining Solution B, 10 ml
- (HSF) Float, 1 unit
- Instructions for Use

Material and equipment required not provided with the kit

Bright field microscope, fridge at 2-8 °C, water bath (s) at 37 °C and 95-100 °C, PVC (polyvinyl chloride) gloves, glass coverslips (24 x 24 mm). Micropipettes, Petri dishes or similar tray, disposable pipettes, distilled water, microwave oven, filter paper or similar, ethanol at 70% and 100%. Phosphate buffer saline (PBS).

Beware that all equipment is calibrated.

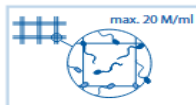
Sperm sample

Fresh semen samples should be collected in a sterile recipient. The sperm DNA fragmentation assay should be performed immediately once the sperm sample has been obtained or thawed after cryopreservation.

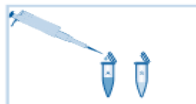
Instructions for use



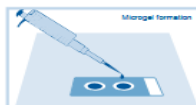
1. Place the Agarose Cell Support (ACS) into the float and melt using a water bath (or a beaker with water on a hot plate) at 95-100 °C for 5 minutes or until it is completely melted. Otherwise, if you prefer melting the agarose using a microwave oven, fill 100 ml of water in a beaker. Then, place the ACS slightly opened with the float inside the beaker and heat it at maximum power for 1.5 minutes. Watch constantly and stop the process as soon as the water starts boiling. Please do not keep the ACS boiling inside the microwave! Aliquot 10 Eppendorf tubes (ET) with 100 µl of the agarose melted. Immediately after, keep the Eppendorf to be used at 37 °C for 5 minutes to prevent the gelification.
- 1.2 The remaining Eppendorf tubes which are not going to be used at that moment will be stored in the fridge along with the kit.
- 1.3 Set Solutions 1 and 2 at room temperature (22-25 °C, approx.) during the whole process.
- 1.4 Prepare and select the Super-Coated Slides (SCS) which are going to be used.



2. Dilute the sperm sample in an appropriate human sperm extender or PBS to a maximum of 20 million sperm per ml.



3. Immediately after, transfer 50 µl of the sperm sample to the Eppendorf tube (ET) and mix gently with a micropipette. The formation of bubbles shall be prevented.



4. Following, place a drop of 8 µl of the cell suspension onto the center of sample well ("S"). Cover with a coverslip. Press gently, avoiding air bubbles formation. Slides must be held in a horizontal position throughout the entire process. Use the "C" well to process a control sample.



5. Place the slide on a cold surface (for example, a metal or glass plate pre-cooled at 2-8 °C) and transfer into the fridge at 2-8 °C, for 5 minutes to solidify the agarose.



6. Take the slide out of the fridge and remove the coverslip by sliding it off gently. All the processing must be performed at room temperature (22-25 °C approx.).



7. Place the slide horizontally in an elevated position as suggested in the figure into a Petri dish or similar tray.
Apply Solution 1 (DA) on the well making sure it is fully covered by the reagent during the whole process. Incubate for 7 minutes. Then, remove the reagent by tilting and place the slide horizontally in an elevated position as suggested in the figure. It is very important to remove the reagent without shaking. We will perform the removal by tilting and letting it slide.



8. Apply Solution 2 (LS) on the well making sure it is fully immersed. Incubate for 20 minutes. Then, remove the reagent by tilting and place the slide horizontally in an elevated position as suggested in the figure. It is very important to remove the reagent without shaking. We will perform the removal by tilting and letting it slide.



9. Wash the slide for 5 minutes covering with abundant distilled water and using a disposable pipette. Then, remove the reagent by tilting and place the slide horizontally in an elevated position as suggested in the figure. Dehydrate by flooding with 70% ethanol, using a disposable pipette and incubate for 2 minutes. Drain and apply 100% ethanol for 2 minutes. Drain and allow to dry on filter paper or similar. After drying, processed slides may be kept in slide boxes at room temperature in a dry and dark place for several months.



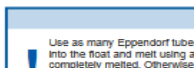
10. Place the slide horizontally in an elevated position into a Petri dish or similar tray. Apply Solution 3 (SSA) on the wells making sure these are fully immersed. Incubate for 7 minutes. Then, remove the stain by tilting and place the slide horizontally in an elevated position.



11. Apply Solution 4 (SSB) on the wells making sure these are fully immersed. Incubate for 7 minutes. Then, remove the stain by tilting. Remove the excess of stain and allow to dry at room temperature.



12. Visualize under bright field microscopy. If the staining is too intense, the slide might be washed with tap water. If the staining is too weak, immerse the slide in 100% ethanol, allow to dry and repeat from step 10.



13. Calculate the percentage of sperm with fragmented DNA. The results should be evaluated considering all clinical and laboratory findings related to the sperm sample.

For future assays

Use as many Eppendorf tubes (ET with aliquoted agarose) as semen samples are going to be evaluated. Place the ET into the float and melt using a water bath (or a beaker with water on a hot plate) at 95-100 °C for 5 minutes or until it is completely melted. Otherwise, if you prefer melting the agarose using a microwave oven, fill 100 ml of water in a beaker. Then, place the ET slightly opened with the float inside the beaker and heat it at maximum power for 1.5 minutes. Watch constantly and stop the process as soon as the water starts boiling. Continue the protocol from step 1.3.
Please do not keep the ACS boiling inside the microwave!

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1
Université Blida 1




Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie et Agro-Ecologie



Laboratoire des Sciences Animales & Recherche en Biobanking
Laboratoire de Biotechnologie de Productions Végétales

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

Etude de la fragmentation de l'ADN spermatique dans l'infertilité masculine

Présenté par :

M^{lle} RAHMANESirine & M^{lle} TAMINDJOUTE Iness

Date de soutenance : 10/07/2025

Devant le Jury :

Mme BOUKENAOU I N.	MCA	ISV. USD-Blida1	Présidente
Mme TARZAALI D.	MCA	ISV. USD-Blida1	Examinatrice
Mme BENAZOUZ F.	MAA	USD-Blida1	Promotrice
Mme BENSALDI A.	BIOLOGISTE	HMEA	Co-Promotrice

Session 2024 / 2025

Avis favorable
TARZAALI D.
Benazouz F.