

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

UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

**Mémoire de fin d'études**

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière Sciences Biologiques

**Option : *Biologie et physiologie de la reproduction***

**Thème**

***Effets délétères des espèces réactives de l'oxygène sur la fragmentation  
de L'ADN nucléaire spermatique chez les hommes infertiles***

**Présenté par :**

**Date de soutenance : 19/07/2022**

\* EULDJI Rabea Maroua

\* ABEDDOU Douaa

<b>Nom</b>	<b>Qualité</b>
Dr.ABDELHOUSSEIN Alia	Président
Dr. BIREM Zahia	Examinatrice
Dr. BENZAZZOUZ Fella	Promotrice

**Promotion : 2021-2022**

## *Remerciements*

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et le courage pour terminer nos études et élaborer ce modeste travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre gratitude.

Nous tenons à remercier aussi notre chère promotrice **Mme BENAZOUZ Fella** pour son soutien enthousiaste, ses conseils savants et sa patience constante qui ont constitué un rapport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.

Nous aimerons exprimer notre gratitude à tous nos professeurs de l'université de **SAAD DAHLAB BLIDA**. Aux personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté de nous rencontrer et de répondre à nos questions durant notre recherche.

Nos vifs remerciements vont également aux **Membres du Jury** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

À tous ces intervenants, nous présentons nos remerciements, notre respect et notre gratitude.

*Dédicace Par Maroua*



*A Ma Très Chère Mère*  
*Achour Leila*

*Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice.*

*Ta prière et ta Bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.*

*Quoique je puisse dire et écrire...*

*Je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance.*

*J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices.*

*Puisse Dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*



*A Mon Très Cher Père  
Euldji Mohamed Quali*

*De tous les pères, tu es le meilleur. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes  
qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme.*

*En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières.*

*En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour.*

*Puisse Dieu vous préserver et vous procurer santé et bonheur.*

**A MES CHERS FRÈRES Merouane, Billél, et Younes,** A tous les moments d'enfance passés avec vous mes frères, en témoignage de ma profonde estime pour l'aide que vous m'avez apportée. Pour votre dévouement, compréhension et grande tendresse. Mes frères qui en plus de m'avoir encouragé tout le long de mes études, m'ont consacré beaucoup de temps et disponibilité, et qui par leur soutien, leurs conseils et leur amour, m'ont permis d'arriver jusqu'à ici car ils ont toujours cru en moi. Que Dieu tout puissant vous accorde une vie saine et heureuse.

**A MES CHÈRE BELLE SŒURS Hayat et Niema,** Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

**A MES CHERS NEVEUX Adam, Nouh, Mohamed et Yamina,** Les meilleur des cadeaux. Votre envie de parcourir le monde, votre enthousiasme, vos sourires, vos yeux brillants sont incomparables. Vous m'apporté beaucoup de bonheur à moi et à notre famille. Je vous aime. Que Dieu vous protège.

**A MA CHÈRE TANTE Goussem,** Qui m'accueille toujours les bras ouverts. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon grand respect et mon estime envers vous. Pour vos conseils, votre tendresse et votre soutien moral. J'implore dieu qu'il vous apporte bonheur et santé.

**HOMMAGE A MA DOUCE TANTE Yamna,** La tante qui aimait comme une mère, qui partageait des heures de plaisir et de rire avec moi et qui me traitait comme la sienne. Ma chère tante qui rêvait de me voir réussir et d'obtenir mon diplôme, je te dédie ce travail. Que Dieu t'accorde la paix éternelle et t'accueille dans son paradis.

**A MA CHÈRE FAMILLE,** Tous ceux qui m'ont transmis leur savoir depuis ma plus tendre enfance. A ce jour, que vous soyez tous remerciés et que cela témoigne de mon éternelle gratitude envers vous. Je ne saurais conclure cette dédicace sans exprimer ma gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué leurs efforts dans le développement de cette mémoire.

**A mon linôme Doua et toute la famille ABEDDOU,** Qui nous a encouragé. Je vous souhaite une vie pleine de bonheurs.

Je vous dédie ce travail, témoignage de ma profonde reconnaissance et mon plus grand attachement.

*Dédicace Par Doua*

**A MA TRÈS CHÈRE MÈRE Hassiba,** Aucune dédicace très chère maman, ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous, vos sacrifices innombrables et votre dévouement firent pour moi un encouragement. Vous avez enduré beaucoup de peine pour mon bien-être et à ma réussite. Reçois ceci en guise de ma reconnaissance et que Dieu te garde longtemps afin que tu puisses goûter aux arbres que tu as plantés.

**A MON TRÈS CHER PÈRE Ahmed,** Mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir. Ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont vous avez fait preuve, de l'encouragement et le soutien que vous ne cessez de manifester, j'espère que vous y trouverez les fruits de votre semence et le témoignage de ma grande fierté de vous avoir comme père. J'implore Dieu, tout puissant, de vous accorder une bonne santé, une longue vie et beaucoup de bonheur.

**A MES CHÈRES SŒURS Aya, Maria, Norhane,** Aucune dédicace ne peut exprimer mon amour et ma gratitude de vous avoir comme des sœurs. Je ne pourrais jamais imaginer la vie sans vous, vous comptez énormément pour moi, Vous êtes des sœurs qui assurent leur rôle comme il faut, je n'oublierai jamais vos encouragements et votre soutien tout au long de mes études, j'ai une grande estime pour vous et je vous aime beaucoup. Je vous souhaite beaucoup de succès, de prospérité et une vie pleine de joie et de bonheur.

**A MES CHERS GRANDS PARENTS Mohamed et Mériem,** Pour votre courage et patience. En témoignage de mon amour, de mon profond respect et de ma reconnaissance. Trouvez ici, chers grands parents, dans ce modeste travail, le fruit de tant de dévouements et de sacrifices ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon profond amour. Que Dieu vous Protège.

**A MA CHÈRE FAMILLE,** Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

**A mon binôme Maroua et toute la famille EULOU,** Qui nous a encouragé. Je vous souhaite une vie pleine de bonheurs.

Je vous dédie ce travail, témoignage de ma profonde reconnaissance et mon plus grand attachement.



## Résumé

L'infertilité masculine idiopathique est représentée chez plus de 30% des couples infertiles. Parmi ses causes, des niveaux anormalement élevés d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans leur sperme. La présence des leucocytes et les spermatozoïdes immatures sont dû à des sources de ROS endogènes, et il existe de nombreuses causes exogènes différentes. D'autre part, différents antioxydants sont présents dans le plasma séminal. De faibles quantités de ROS sont nécessaires pour la fécondation, mais des niveaux élevés de ROS provoquent un stress oxydatif et peuvent avoir des effets négatifs tels que la peroxydation des lipides membranaires, la fragmentation de l'acide désoxyribonucléique du sperme et l'apoptose sur la capacité fertile. Afin d'évaluer l'impact du stress oxydatif, nous avons réalisé une étude théorique à base d'études sur la fragmentation de l'ADN pour mieux cerner et démontrer l'apport direct et indirect sur l'expression des ROS et leurs effets sur la fragmentation de l'ADN au cours de la fécondation. Cependant, nous avons révélé dans notre recherche plusieurs facteurs endogènes et exogènes qui pourraient entraîner des niveaux supra-physiologiques de ROS, notamment la qualité du sperme, la cryoconservation et les corrélations positives significatives entre le nombre de leucocytes et les graines de ROS ( $r_s = 0,70$ ,  $p = 0,001$  ;  $n = 125$ ) et le nombre de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN ( $r_s = 0,43$ ,  $p = 0,032$  ;  $n = 25$ ). En outre, il existe une corrélation entre l'augmentation des niveaux de ROS séminaux et l'augmentation des niveaux de 4-HNE, la fragmentation de l'ADN et l'activité de la caspase-3 ( $p = 0,001$ ). Ces événements importants provoquent la rupture de l'ADN des spermatozoïdes, l'apoptose et la peroxydation lipidique, qui contribuent tous à l'infertilité.

**Mots clés :** Infertilité masculine, Espèces réactives de l'oxygène, Fragmentation d'ADN spermatique, Corrélation, Spermatozoïdes

## Abstract

Idiopathic male infertility is represented in more than 30% of infertile couples. Among its causes, abnormally high levels of reactive oxygen species (ROS) in their semen. The presence of leukocytes and immature spermatozoa are due to endogenous ROS sources, and there are many different exogenous causes. On the other hand, various antioxidants are present in seminal plasma. Low amounts of ROS are necessary for fertilization, but high levels of ROS cause oxidative stress and can have negative effects such as membrane lipid peroxidation, sperm deoxyribonucleic acid fragmentation and apoptosis on fertility. In order to evaluate the impact of oxidative stress, we conducted a theoretical study based on DNA fragmentation studies to better identify and demonstrate the direct and indirect contribution on ROS expression and its effects on DNA fragmentation or during fertilization. However, we have revealed several endogenous and exogenous factors in our research that might result in supra-physiological levels of ROS, including sperm quality, cryopreservation, and the significant positive correlations between the number of leukocytes and both ROS seeds ( $r_s = 0.70$ ,  $p = 0.001$ ;  $n = 125$ ) and the number of spermatozoa with DNA fragmentation ( $r_s = 0.43$ ,  $p = 0.032$ ;  $n = 25$ ). Furthermore, there is a correlation between enhanced seminal ROS levels and raised levels of 4-HNE, DNA fragmentation, and caspase-3 activity ( $p = 0.001$ ). These important events cause sperm DNA breakage, apoptosis, and lipid peroxidation, which all contribute to infertility.

**Keywords:** Male infertility, Reactive oxygen species, spermatid DNA fragmentation of, Correlation, Sperm.

## ملخص

على الرغم من أن عامل العقم الذكوري مجهول السبب في أكثر من 30 ٪ من الأزواج الذين يعانون من العقم. من بين أسبابه ، مستويات عالية بشكل غير طبيعي من أنواع الأكسجين التفاعلية (روس) في السائل المنوي. وجود الكريات البيض والحيوانات المنوية غير ناضجة ويرجع ذلك إلى مصادر روس الذاتية ، وهناك العديد من الأسباب الخارجية المختلفة. من ناحية أخرى ، توجد مضادات الأكسدة المختلفة في البلازما المنوية. كميات منخفضة من روس ضرورية للتخصيب ، ولكن مستويات عالية من روس تسبب الإجهاد التأكسدي ويمكن أن يكون لها آثار سلبية مثل بيروكسيد الدهون الغشاء ، تجزئة حمض ديوكسي ريبونوكلييك الحيوانات المنوية وموت الخلايا المبرمج على الخصوبة. من أجل تقييم تأثير الإجهاد التأكسدي ، أجرينا دراسة نظرية تستند إلى دراسات تجزئة الحمض النووي لتحديد وإظهار المساهمة المباشرة وغير المباشرة بشكل أفضل في تعبير روس وتأثيراته على تجزئة الحمض النووي أو أثناء الإخصاب. ومع ذلك ، فقد كشفنا العديد من العوامل الداخلية والخارجية في بحثنا التي قد تؤدي إلى مستويات أعلى من الفسيولوجية للروس ، بما في ذلك جودة الحيوانات المنوية ، والحفظ بالتبريد ، والارتباطات الإيجابية الهامة بين عدد الكريات البيض وكل من بذور روس (رس = 0.70 ، ص = 0.001 ؛ ن = 125) وعدد الحيوانات المنوية مع تجزئة الحمض النووي (رس = 0.43 ، ع = 0.032 ؛ ن = 25). وعلاوة على ذلك ، هناك علاقة بين تعزيز مستويات روس المنوية ومستويات مرتفعة من 4-هني ، تجزئة الحمض النووي ، والنشاط كاسباس-3 (ع = 0.001). هذه الأحداث الهامة تسبب كسر الحمض النووي للحيوانات المنوية ، موت الخلايا المبرمج ، وبيروكسيد الدهون ، والتي تسهم جميعها في العقم.

**عناصر المحتوى:** العقم عند الرجال، انكسار الحمض النووي المنوي، ارتباط، الحيوانات المنوية.

# Tableau des Matières

Remerciement

Dédicaces

Résumé

Abstract

المخلص

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des Abréviations

Introduction Générale 1

Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

1	Appareil génital Masculin .....	4
1.1	Testicule .....	4
1.2	Epididyme .....	5
1.3	Glandes annexes.....	5
1.4	Pénis.....	6
1.5	Processus de la spermatogenèse dans le tube séminifère .....	6
1.5.1	Spermatogenèse.....	6
1.5.2	Spermiogénèse .....	8
1.6	Cytophysiologie de la spermatogenèse .....	10
1.7	Capacitation.....	11
1.8	Etapas de la fécondation .....	12
1.8.1	Traversée du cumulus.....	12
1.8.2	Interaction avec la zone pellucide .....	12
1.8.3	Fusion des gamètes.....	13
1.8.4	Activation de l'ovocyte .....	13
1.8.5	Incorporation et la transformation du spermatozoïde (SPZ).....	14
1.9	Restauration de la diploïdie .....	14

2	Différentes causes de l'infertilité masculine .....	15
2.1	Anomalies de l'éjaculation .....	15
2.2	Cause immunologique.....	16
2.3	Anomalies Congénitales.....	16
2.4	Infection des glandes annexes.....	16
2.5	Leucocytes.....	16
2.6	Cause Iatrogénique .....	16
2.7	Radiothérapie .....	17
2.8	Chimiothérapie.....	17
2.9	Obésité.....	17
2.10	Tabagisme.....	18
2.11	Alcool.....	18
2.12	Chaleur .....	18
2.13	Infertilité Idiopathique.....	18
3	ADN Spermatique .....	18
3.1	Structure d'ADN.....	19
3.2	Structure de la chromatine spermatique .....	19
3.3	Rôle de la condensation de la chromatine spermatique.....	21
3.4	Relation entre la structure chromatique et l'altération d'ADN chez les spermatozoïdes des mammifères .....	22
3.5	Télomères et la reproduction masculine.....	22
3.6	Fragmentation de l'ADN spermatique.....	23
3.6.1	Fragmentation d'ADN pendant la spermiogénèse .....	23
3.6.2	Différentes causes de fragmentation d'ADN spermatique .....	23

**Chapitre 2 : Matériels et Méthodes**

1	Critères de base dans le choix des articles .....	29
2	Transition de perméabilité mitochondriale augmente la production de ROS qui induit la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes humains .....	31
3	Statut de stress oxydatif et fragmentation de l'ADN du sperme chez les hommes fertiles et infertiles 32	
4	Analyse de la fragmentation de l'ADN, de la translocation membranaire plasmique de la phosphatidylsérine et du stress oxydatif chez les spermatozoïdes humains .....	34
5	Intérêt de l'étude de l'oxydation de l'ADN des spermatozoïdes par marquage de la 8-oxo-guanine en cytométrie en flux chez l'homme infertile.....	35
6	Leucospermie, stress oxydatif et fertilité masculine : certitudes et hypothèses.....	36

7	Dommages à l'ADN des spermatozoïdes induits par le stress oxydatif .....	38
8	Stress oxydatif de l'éjaculat est lié à la fragmentation de l'ADN du sperme et aux cellules rondes ...	39
9	Dommages à l'ADN des spermatozoïdes induits par la codéine sont principalement dus au stress oxydatif plutôt qu'à l'apoptose .....	41
10	Valeur prédictive du test de stress oxydatif du sperme pour la fragmentation de l'ADN du sperme évaluée par le test de dispersion de la chromatine du sperme .....	43
11	Une comparaison entre deux tests pour mesurer le stress oxydatif séminal et leur relation avec la fragmentation de l'ADN du sperme et les paramètres du sperme .....	44
12	Relation entre la fragmentation de l'ADN du sperme, les radicaux libres et la capacité antioxydante avec la perte de grossesse répétée idiopathique .....	45
13	Microdélétions du chromosome Y, fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et stress oxydatif des spermatozoïdes comme causes d'avortement spontané récurrent d'étiologie inconnue .....	47
14	Développement du test NBT comme marqueur du stress oxydatif du sperme.....	49
15	Implication des leucocytes séminaux, des espèces réactives de l'oxygène et du potentiel de la membrane mitochondriale des spermatozoïdes dans les dommages à l'ADN des spermatozoïdes humains 50	
16	Fragmentation et l'oxydation de l'ADN du sperme sont indépendantes du malondialdéhyde .....	52
17	Effet du statut redox séminal sur la peroxydation lipidique, l'apoptose et la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes d'hommes saoudiens infertiles .....	53
18	Dommages à l'ADN du sperme humain induits par la cryoconservation sont principalement médiés par le stress oxydatif plutôt que par l'apoptose .....	55
19	Utilisation d'ordinateurs portables connectés à Internet via Wi-Fi diminue la motilité des spermatozoïdes humains et augmente la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes .....	57
<b>Chapitre 3 : Résultats et Discussion</b>		
1	Effet des ROS sur l'ouverture des pores de la membrane mitochondriale interne .....	60
2	Impact du ROS sur la motilité et le nombre des spermatozoïdes .....	63
3	Effet du ROS sur l'induction de l'apoptose précoce.....	64
<b>Conclusion Générale</b>		<b>69</b>
<b>Référence Bibliographie</b>		<b>72</b>
<b>Annexe</b>		<b>90</b>

# Liste des Figures

Figure 1 : Appareil génital de l'homme (Angela et al., 2016).....	4
Figure 2 : Structure histologique des tubes séminifères (Muller et Clos, 1997).....	5
Figure 3 : Coupe sagittale de l'appareil génitale masculin (Sanofi-Aventis France).....	6
Figure 4 : Schéma de la phase de multiplication des cellules germinales males (Humeau <i>et al.</i> , 2005).....	7
Figure 5 : Coupe transversale de tube séminifère (Humeau et al., 2005). ....	7
Figure 6 : Schéma représentatif des modifications cytologiques au cours de la spermiogénèse (Blanc et al., 1998)....	9
Figure 7 : Ultra structure du spermatozoïde humain. Schéma de la cellule en coupe longitudinale (Pei Ph, 2005). ...	10
Figure 8 : Schéma des différentes composantes de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire (Quang Nhuan, 2002). .....	11
Figure 9 : La réaction corticale (Alain, 2016).....	14
Figure 10 : Les étapes de la fécondation (Patrick Villette, 2012). ....	15
Figure 11 : Schéma représentatif des changements cellulaires et chromatique majeurs qui se produisent durant la spermatogénèse (Cheung et al., 2009).....	20
Figure 12 : Un modèle de la structure de la chromatine spermatique chez l'Homme (Ward, 2010). ....	21
Figure 13 : Schéma représentatif de la relation entre la longueur des télomères et le développement chez les mammifères (Kalmbach et al., 2013). ....	22
Figure 14 : Le rôle de Fas pendant la spermatogénèse chez l'homme avec les paramètres spermatiques (a) normaux et (b) anormaux (oligospermiques, asthénospermiques et tératospermique) (Sakkas et al., 1999). ....	24
Figure 15 : Les facteurs majeurs de fragmentation d'ADN spermatique (Shamsi et al., 2012). ....	27
Figure 16 : mPTP : Les effets de l'ouverture de mPTP sur la fragmentation de l'ADN dans des spermatozoïdes humains (Treulen et al., 2015). ....	31
Figure 17 : Corrélations de Spearman entre la fragmentation de l'ADN du sperme chez les hommes fertiles (Dorostghoal et al., 2017). ....	32
Figure 18 : Corrélations de Spearman entre la fragmentation de l'ADN du sperme chez les hommes infertiles (Dorostghoal et al., 2017). ....	33
Figure 19 : Coefficient de corrélation de Pearson entre le pourcentage de fragmentation de l'ADN (Barroso et al., 2000).....	34
Figure 20 : Profils du marquage de la 8-oxo-guanine obtenus par cytométrie en flux chez les deux populations témoins et patient (Chakroun et al., 2008). ....	35
Figure 21 : La fragmentation de l'ADN dans spermatozoïdes normaux et anormaux (Lemkecher et al., 2005). ....	36
Figure 22 : Étude sur la corrélation de l'apoptose à la production de ROS chez les patients infertiles. ....	37
Figure 23 : Différents niveaux de MDA dans le plasma de sperme (Hosen et al., 2015). ....	38
Figure 24 : Différents niveaux de 8-OHdG dans le plasma de sperme (Hosen et al., 2015). ....	38
Figure 25 : Statistiques récapitulatives de la concentration de DFI (Iommiello et al., 2015). ....	39
Figure 26 : Statistiques récapitulatives de la concentration de cellules rondes liées au niveau d'OS (Iommiello et al., 2015).....	39
Figure 27 : Une analyse de régression multivariée entre les dommages oxydatifs de l'ADN et l'apoptose (Ajayi et al., 2020).....	41
Figure 28 : Mécanisme proposé de l'effet de la codéine sur les spermatozoïdes (Ajay et al., 2020). ....	42
Figure 29 : Les niveaux de fragmentation de l'ADN du sperme (SDF) et du potentiel d'oxydo-réduction (ORP) dans les cohortes (Elbardisi et al., 2020).....	43
Figure 30 : Corrélation entre le stress oxydatif, l'intégrité génétique du sperme et les paramètres du sperme for ROS (Homa et al., 2019). ....	44
Figure 31 : Corrélation entre le stress oxydatif, l'intégrité génétique du sperme et les paramètres du sperme for DFI (Homa et al., 2019). ....	44

Figure 32 : La moyenne $\pm$ SD de la fragmentation de l'ADN du sperme mesurée par TUNEL chez les patients RSA et les hommes fertiles comme groupe témoin (Kamkar et al., 2018).....	45
Figure 33 : Moyenne $\pm$ SD des radicaux libres avec luminescence chez les patients RSA et les hommes fertiles comme groupe témoin (Kamkar et al., 2018).....	45
Figure 34 : Analyse de la courbe ROC de la valeur prédictive de la fragmentation et de l'oxydation de l'ADN du sperme pour prévoir le RSA en tenant compte des hommes avec des paramètres de sperme normaux (Bellver et al., 2010).....	47
Figure 35 : nalyse de la courbe ROC de la valeur prédictive de la fragmentation et de l'oxydation de l'ADN du sperme pour prévoir le RSA (Bellver et al., 2010).....	47
Figure 36 : Analyse de régression linéaire illustrant la relation entre la production de ROS, la motilité des spermatozoïdes, apoptose précoce (coloration à l'annexine V) et la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (dosage TUNEL) (Tunc et al., 2010).....	49
Figure 37 : Analyses de corrélation entre la concentration de leucocytes, la motilité des spermatozoïdes, la concentration, les ROS séminales et le nombre de spermatozoïdes présentant une fragmentation de l'ADN (Lobascio et al., 2015).....	51
Figure 38 : Statistiques récapitulatives des paramètres du sperme dans la population étudiée (n = 55) (Zribi et al., 2011).....	52
Figure 39 : Comparaison des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène séminal (ROS) entre les groupes fertiles normozoospermiques (témoin) et asthénozoospermiques (AST) et oligoasthénotérozoospermies (OAT) (Fatima et al., 2020).....	53
Figure 40 : Comparaison de l'activité de la caspase-3 dans les lysats de spermatozoïdes issus des groupes fertiles normozoospermiques (témoins) et asthénozoospermiques (AST) et oligoasthénoteratozoospermies (OAT) (Fatima et al., 2020).....	53
Figure 41 : Fragmentation de l'ADN dans le sperme humain déterminée par le test TUNEL (Fatima et al., 2020). ...	54
Figure 42 : Effet de la cryoconservation sur la fragmentation de l'ADN du sperme, la 8OHdG et l'apoptose (Fraction à haute densité) (Thomson et al., 2009). ....	55
Figure 43 : Effet de la cryoconservation sur la fragmentation de l'ADN du sperme, la 8OHdG et l'apoptose (Non Fractioné) (Thomson et al., 2009). ....	55
Figure 44 : Exposition à un ordinateur portable et fragmentation de l'ADN du sperme humain (Avendano et al., 2012). ....	57
Figure 45 : Les effets de l'ouverture de mPTP sur la fragmentation de l'ADN dans des spermatozoïdes humains. ....	60
Figure 46 : Analyses de corrélation entre la concentration de leucocytes, la motilité des spermatozoïdes, la concentration, les ROS séminales et le nombre de spermatozoïdes présentant une fragmentation de l'ADN. ...	63
Figure 47 : Comparaison des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène séminal (ROS) entre les groupes fertiles normozoospermiques (témoin) et asthénozoospermiques (AST) et oligoasthénotérozoospermies (OAT). ....	65
Figure 48 : Comparaison de l'activité de la caspase-3 dans les lysats de spermatozoïdes issus des groupes fertiles normozoospermiques (témoins) et asthénozoospermiques (AST) et oligoasthénoteratozoospermies (OAT). ...	65
Figure 49 : Fragmentation de l'ADN dans le sperme humain déterminée par le test TUNEL. ....	65



# Liste des Tableaux

Tableau 1 : Présentation de la nature de données utiliser durant la recherche. ....	29
Tableau 2 : Répartition des articles analysés et leurs références.....	30

# Liste des Abréviations

**4-HNE** : 4-Hydroxynonenal.

**8-Ohdg** : 8-Hydroxyguanosine.

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique.

**ANT** : Adenine Nucleotide Transporter.

**ART** : Assisted Reproductive Technology.

**AST** : Asthenozoospermics.

**ATP/Atpase1** : Adenosine Triphosphatase.

**BMI** : Indice De Masse Corporelle.

**Calcéine-AM** : Calcéine Acétoxyméthyle.

**Catsper1** : Cation Channel Sperm-Associated Protein.

**Dcm** : Mitochondrial Membrane Potential.

**DDT** : Dichlorodiphényltrichloroéthane.

**DFI** : Indice De Fragmentation D'adn.

**DGC** : Density Gradient Centrifugation.

**DTT** : Dithiothréitol.

**Fas** : Apoptosis Stimulating Fragment.

**Fasl** : Ligand De Fas.

**FIV** : Fécondation In Vitro.

**FSH** : Folliculo-Stimulating Hormone.

**Gnrh** : Gonadotrophine Releasing Hormone.

**Gpx** : Glutathion Peroxydase.

**Gy** : Le Gray (Symbole Gy) L'unité Dérivée De Dose Absorbée Du Système International (SI) D'unités.

**H2AX** : Histone Protein Family Member X.

**H4, H2A, H2B** : Octamère D'histones Et D'adn.

**HDS** : High DNA Satiability.

**HOS** : High Oxidative Stress.

**IAGM** : Infection De Glandes Accessoires Masculines.

**Iga** : Immunoglobuline A.

**Igg** : Immunoglobuline G.

**Igm** : Immunoglobuline M.

**LH** : Luteinizing Hormone.

**LOS** : Low Oxidative Stress.

**LPO** : Lipid Peroxidation.

**MDA** : Malondialdéhyde.

**MFI** : Mean Fluorescence Intensity.

**MMP** : Potentiel De Membrane Mitochondriale.

**MPG** : N-Methylpurine-DNA Glycosylase

**MPT** : Mitochondrial Permeability Transition.

**Mptp** : Mitochondrial Permeability Transition Pore.

**NADPH** : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate.

**NBT** : Nitro Blue Tetrazolium.

**OAT** : Oligoasthénoteratozoospermia.

**OAT** : Oligoasthénoteratozoospermies.

**OH** : Oxygen And Hydrogen.

**OMS** : Organisation Mondiale De La Santé.

**ORP** : Oxidation-Reduction Potential.

**OS** : Oxidative Stress.

**Oxydna** : Oxidized DNA Fragments.

**PCB** : Polychlorobiphényles.

**PI** : Propidium Iodide.

**PMA** : Procréation Médicalement Assistée.

**RF-EMW** :

**ROC** : Receiver Operator Curve.

**ROS** : Reactive Oxygen Species.

**RPL** : Repeated Pregnancy Loss.

**RSA** : Recurrent Spontaneous Abortion.

**SCD** : Sperm Chromatin Dispersion.

**SCSA** : Sperm Chromatin Structure Assay.

**SD** : Standard Deviation.

**SDF** : Sperm DNA Fragmentation.

**SNDL** : Le Système National De Documentation En Ligne (SNDL).

**SOD** : Superoxydes Dismutase.

**SPC** : S-Phase Promoting Complex.

**SPZ** : Spermatozoïdes.

**TAS** : Total Antioxidant Status.

**TUNEL** : Nick End Labeling.

**TUNEL** : Terminaluridine Nick-End Labeling.

**UDP** : 2'-Deoxyuridine-5'-Triphosphate.

**UDP** : 2'-Deoxyuridine-5'-Triphosphate.

**ZP3** : Zona Pellucida Sperm-Binding Protein.

**µm** : Micromètre.

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## Introduction Générale

L'infertilité est un problème croissant qui touche un nombre graduel de couples qui essaient de concevoir un enfant. La raison de ce facteur est que les couples sont plus proactifs pour révéler leur infertilité et conseiller en conséquence, et l'incidence de cette maladie a en effet augmenté. Dans le monde, plus de 70 millions de couples sont infertiles (**Boivin *et al.*, 2007**).

L'infertilité est l'incapacité d'un couple à concevoir une grossesse après 12 mois de rapports sexuels réguliers non protégés (**Liu et Handelsman, 2003**). En Algérie, le ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière a estimé que 300 000 couples mariés sont incapables de concevoir naturellement (**Santé-MAG N°19 - Juin 2013**).

Le facteur masculin est impliqué dans près de la moitié des cas d'infertilité. La contribution du partenaire masculin à l'infertilité dans les couples est évaluée à l'aide du système de classification proposé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (**Rowe *et al.*, 1993**). L'étiologie de l'infertilité masculine se manifeste généralement par des changements dans un ou plusieurs paramètres du sperme.

Cependant, les tests utilisés pour évaluer la fertilité masculine restent peu prédictifs du début de la grossesse et il s'est avéré difficile de définir une valeur seuil pour les tests appliqués. De nombreuses personnes ont des avis différents sur l'utilité de ces donneurs de sperme dans le domaine de la Procréation Médicalement Assistée (PMA) (**Rowe *et al.*, 1993**).

Les progrès récents de la biologie de la reproduction ont amélioré notre compréhension de la physiologie des spermatozoïdes et de leur contribution à la fécondation (**Sergie *et al.*, 2005**). L'intégrité de la chromatine et de l'ADN des spermatozoïdes est essentielle pour assurer un développement embryonnaire réussi, qui est le seul but de la conception (**Barratt *et al.*, 2010**).

Étant donné que le stress oxydatif est une pathologie courante affectant la fonction des spermatozoïdes chez de nombreux hommes infertiles, il est important de connaître les causes sous-jacentes de ce stress, afin de cibler plus efficacement le traitement. L'objectif de cette thèse est d'améliorer notre compréhension des causes du stress oxydatif chez les hommes infertiles, ainsi que d'étudier les causes sous-jacentes des ROS (Reactive oxygen species) et les mécanismes par

lesquels le stress oxydatif se développe. Nous espérons apporter une contribution significative au diagnostic, à la prévention et au traitement de l'infertilité masculine.

Le présent mémoire est organisé en ces trois chapitres et sera conclu par une conclusion générale :

- ❖ Chapitre 1 : Ce chapitre servira de rappel bibliographique des concepts et descriptions les plus importants dans notre recherche.
- ❖ Chapitre 2 : Ce chapitre présentera visuellement une analyse des travaux antérieurs d'autres chercheurs.
- ❖ Chapitre 3 : Ce chapitre reprend les principaux facteurs que nous avons analysés dans les articles précédents.

# **CHAPITRE 1**

## **Rappel Bibliographique**



### 1 Appareil génital Masculin

Le système reproducteur masculin contient une variété d'organes et de structures qui permettent la production, la maturation, le stockage et le transport du sperme vers le système reproducteur féminin. Il contient les testicules, l'épididyme, le canal déférent, le canal éjaculateur des deux côtés, et les organes sont modifiés dans la dernière partie : le système génito-urinaire et la prostate (**Figure 1**). La structure des organes génitaux masculins décrite ci-dessous respecte le cheminement des spermatozoïdes depuis leur production jusqu'à leur émission (**Dadoune. 2006, Humeau et Arnal. 2008**).

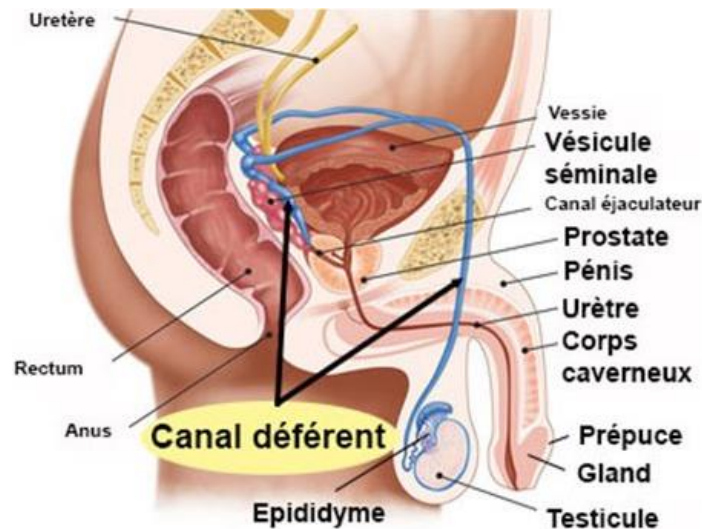


Figure 1 : Appareil génital de l'homme (Angela et al., 2016).

#### 1.1 Testicule

Sur la **Figure 2**, Les deux testicules sont situés dans le scrotum à l'extérieur de la cavité abdominale. Ils ont deux fonctions principales : exocrine et endocrine. Les fonctions exocrines et endocrines sont responsables de la production de spermatozoïdes et d'hormones sexuelles, comme la testostérone. Le testicule est protégé par une capsule de tissu fibreux, la tunique albuginée, qui contient des cellules musculaires lisses. Au bord supérieur du testicule, la tunique albuginée s'épaissit et s'enfonce, formant les corps de Hemmer, qui sont perforés par les vaisseaux sanguins et les conduits qui composent le rete testiculaire. Les tubes séséminifères sont constitués par une fine membrane conjonctive externe appelée membrane propre et un épithélium germinal.

La membrane proprement dite contient des cellules contractiles semblables à des muscles qui jouent un rôle important dans l'élimination des spermatozoïdes des tubules séminifères. Il existe deux types de cellules dans l'épithélium embryonnaire : les cellules de Sertoli et les cellules germinales. Chaque tube séminifère se termine par une portion rectiligne du tube séminifère qui

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

se termine par le rete testis. Ce dernier est expulsé par le canal épiddymaire, le canal efférent, qui se prolonge par le canal épiddymaire.

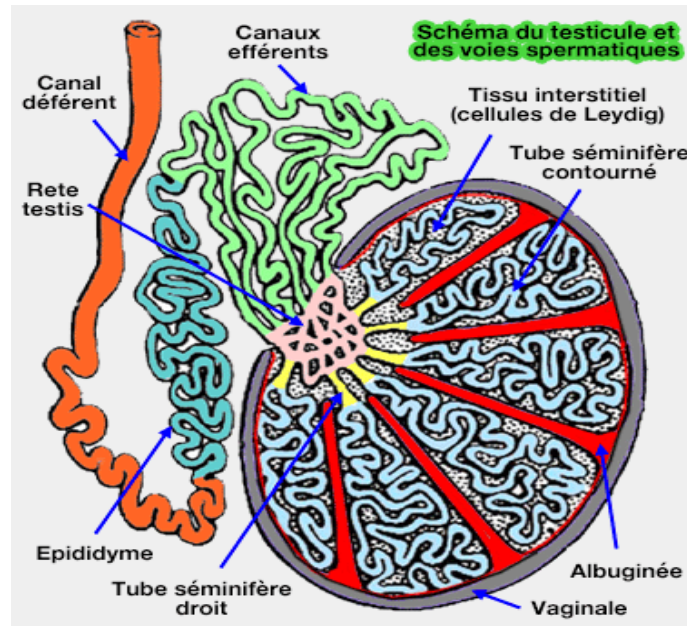


Figure 2 : Structure histologique des tubes séminifères (Muller et Clos, 1997).

### 1.2 Epididyme

Structure semblable à une virgule. Sa tête, qui contient le tubule efférent et en reçoit les spermatozoïdes, recouvre la surface supérieure des testicules. Son corps et sa queue sur la surface postéro-latérale du testicule contiennent une partie très sinueuse de l'épididyme appelée épiddyme (Marieb et al., 1999).

### 1.3 Les glandes annexes

Le liquide éjaculateur est composé d'un mélange de sécrétions divisées en quatre parties, et les deux tiers des spermatozoïdes sont contenus dans la première moitié du liquide éjaculateur :

- ❖ Fraction pré-éjaculatoire : Lors de l'excitation sexuelle, les sécrétions proviennent des glandes de la vache, qui semblent lubrifier le flux de sperme.
- ❖ Les glandes prostatiques produisent des enzymes qui permettent de liquéfier l'éjaculat.
- ❖ Fraction principale : Un mélange de sécrétions prostatiques et de vésicules séminales impliquées dans la formation du coagulum séminal.
- ❖ Fraction terminale : Il se compose de sécrétions des vésicules séminales et est plus liquide (Jouannet, 2001).

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

### 1.4 Le pénis

Le pénis est l'organe de l'accouplement et est destiné à déposer le sperme dans l'appareil reproducteur féminin (Marieb et al., 1999). Le pénis est constitué d'une racine fixe et d'un corps mobile et se termine par un renflement, le gland du pénis. Le pénis est un organe spécial composé de trois rangées de tissu érectile rempli de sang, permettant la pénétration du pénis dans le vagin pendant les rapports sexuels (Figure 3).

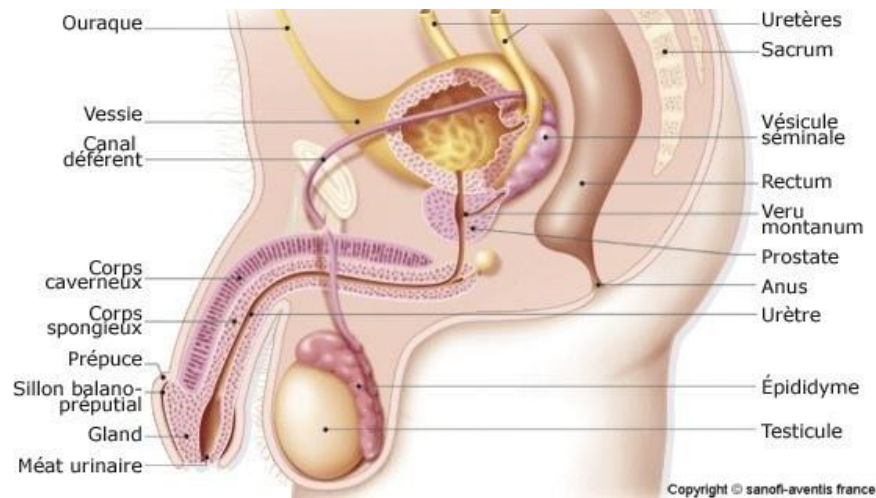


Figure 3 : Coupe sagittale de l'appareil génitale masculin (Sanofi-Aventis France).

### 1.5 Processus de la spermatogenèse dans le tube séminifère

#### 1.5.1 La spermatogenèse

La spermatogenèse est le processus intégré de prolifération cellulaire, de méiose et de maturation cellulaire, aboutissant à la formation de spermatozoïdes matures ; cela va acquérir la capacité de féconder dans l'épididyme (Clermont, 1972). Ce processus se déroule dans les tubules séminifères à l'intérieur desquels les cellules de Sertoli assurent le support du développement des cellules germinales (Volg, 1988).

Les cellules de Sertoli représentent une structure unique du testicule, et lorsque la différenciation cellulaire se produit, les cellules de la lignée spermatique se déplacent de la membrane basale vers la lumière des tubules séminifères. Les spermatozoïdes matures sont libérés dans la lumière des tubules séminifères. Il est transporté jusqu'à l'épididyme et stocké en attendant l'éjaculation (Figure 4) (Clermont, 1972).

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

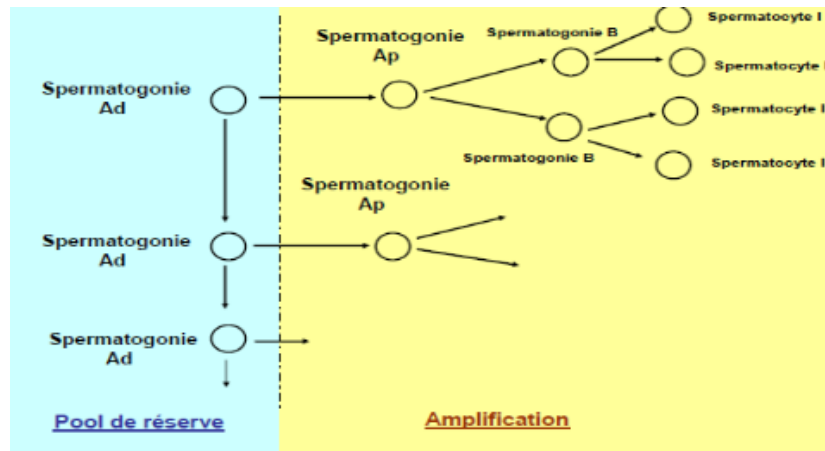


Figure 4 : Schéma de la phase de multiplication des cellules germinales males (Humeau *et al.*, 2005).

### ❖ La phase d'accroissement

Les spermatozoïdes de dernière génération cessent de se diviser, augmentent de volume et se transforment en spermatozoïdes de premier ordre (cellules diploïdes), qui se verrouillent dans les premiers stades de la prophase méiotique jusqu'à la puberté (Figure 5).

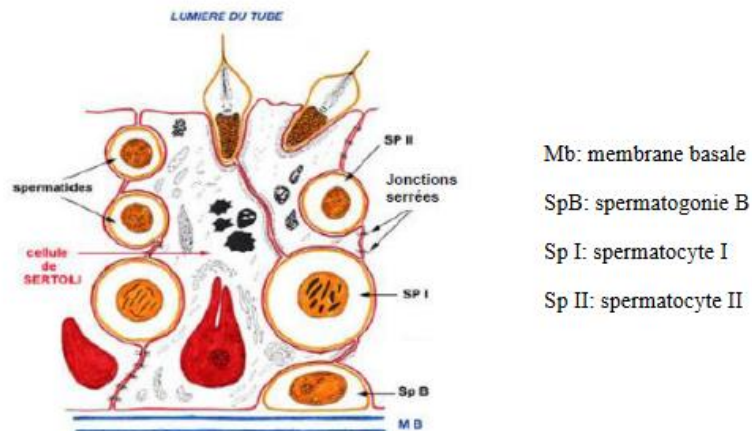


Figure 5 : Coupe transversale de tube séminifère (Humeau *et al.*, 2005).

### ❖ La phase de maturation

Les spermatocytes subissent la méiose, deux divisions qui vont réduire de moitié le nombre de chromosomes et la quantité d'ADN.

### ❖ Première division de méiose ou division réductionnelle

Les spermatocytes (chromosomes  $2n$ , ADN  $2q$ ) se divisent pour former deux spermatocytes contenant chacun 1 copie du chromosome 2 et l'ADN du chromosome 4. Cette phase est longue et dure plusieurs jours (23 jours). (Amann, 2008), (De Krester, 2007).

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

### ❖ Deuxième division de méiose ou division équationnelle

Elle conduit d'un spermatocyte II à deux spermatides avec (n chromosomes, q ADN). La durée de cet événement est courte et dure quelques heures.

### 1.5.2 La Spermiogénèse

La spermatogénèse est un processus de maturation et de métamorphose cellulaire qui permet aux spermatozoïdes ronds de se transformer en une structure super organisée, un spermatozoïde mobile.

Cette étape n'inclut pas la division cellulaire, mais comprend la morphogénèse de l'acrosome, la condensation nucléaire, le développement flagellaire, l'épuisement cytoplasmique, la réorganisation des organites et la spermatogénèse. (Kerr *et al.*, 2006), (De Krester 2007).

#### ❖ La formation de l'acrosome :

L'appareil de Golgi fournit de nombreuses vésicules qui se rassemblent pour former une seule vésicule : la vésicule pro-acrosomique. Ces derniers sont aplatis et étalés au niveau du pôle antérieur du noyau sous la forme d'une coiffe acrosomique : c'est l'acrosome qui est très riche en enzymes hydrolytiques (hyaluronidase, acrosine, etc.) (Kerr *et al.*, 2006).

#### ❖ La formation du flagelle :

Les deux centrioles se développent à partir de l'appareil de Golgi.

- Le centriole proximal : Il est situé dans une légère dépression du noyau près du pôle opposé à l'acrosome et il ne sera pas modifié.
- Le centriole distal : Il disparaît progressivement et est remplacé par une structure complexe en forme d'entonnoir : la structure axonémale. Au fur et à mesure que la structure se développe, les microtubules du centriole distal s'allongent et s'organisent en un axonème typique. Cet axonème s'allonge et émerge de la cellule en repoussant la membrane plasmique. (Kerr *et al.*, 2006).

❖ **La condensation du noyau :** Le noyau rétrécit, se condense et prend une forme aplatie typique. L'acrosome est coiffé à sa partie antérieure. Le noyau et l'acrosome constituent la tête du spermatozoïde (De Krester, 2007).

#### ❖ La réduction du cytoplasme et la réorganisation de ses organites :

La pièce de liaison entre la pièce médiane et la tête d'un spermatozoïde mature est l'axonème. Les fibres externes denses et le revêtement fibreux se développent tous deux au cours du processus de spermiogénèse. En plus d'assurer la stabilité du flagelle, la pièce intermédiaire pourrait également jouer un rôle d'échafaudage moléculaire dans le

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

positionnement d'enzymes clés telles que CatSper1 (hyperactivation et capacitation) et Calcium ATPase1 (hyperactivation), nécessaires à la motilité des spermatozoïdes. (De Krester, 2007).

L'enveloppe mitochondriale de la pièce médiane se forme à l'issue de la réorganisation du cytoplasme et des organites. Les mitochondries à la périphérie de la spermatide se rejoignent en spirale autour de la région proximale du flagelle (la pièce médiane du spermatozoïde mature). Cette forme hélicoïdale offre moins de résistance à la flexion. (De Krester, 2007).

Ensuite, les spermatozoïdes sont séparés des cellules de Sertoli (spermatogénèse), au cours de laquelle le cytoplasme qui s'est déplacé vers la position caudale est dégradé puis phagocyté par les cellules de Sertoli. (Figure 6).

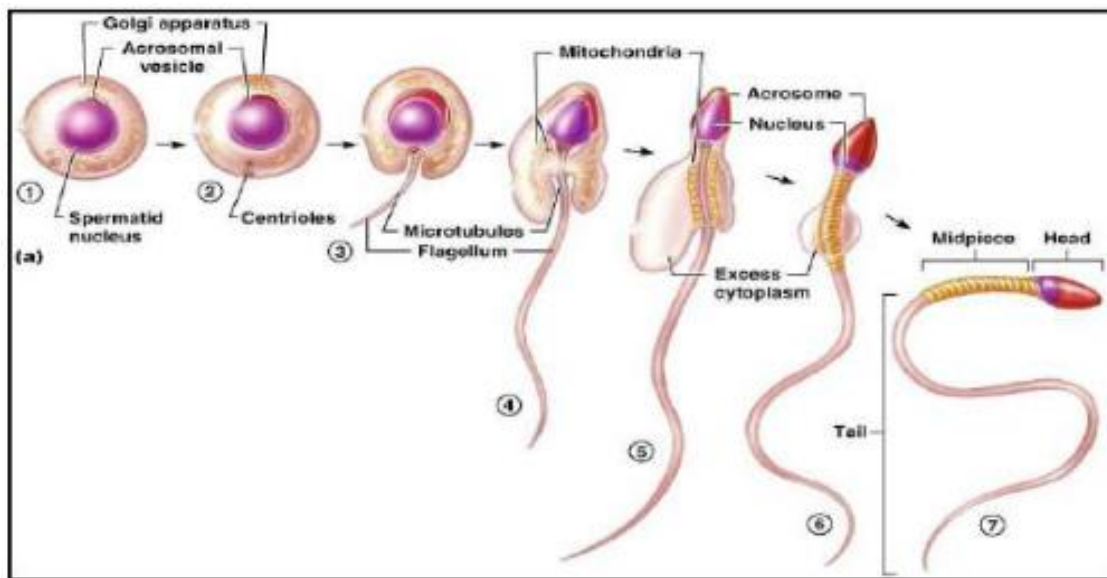


Figure 6 : Schéma représentatif des modifications cytotogiques au cours de la spermiogénèse (Blanc et al., 1998).

### ❖ La maturation post-testiculaire :

Les spermatozoïdes libérés dans la lumière des tubules séminifères ne sont pas encore fonctionnels et ne peuvent féconder un ovocyte (Figure 7). C'est lors de leur passage dans l'épididyme qu'ils subiront une série de modifications qui leur permettront d'acquérir leur pouvoir fécondant (mobilité, capacité à féconder un ovocyte).

L'un de ces changements est que les protéines épидидymaires modifient la position des lipides et des protéines de la membrane plasmique du sperme pour former un complexe de signalisation essentiel à la fécondation (Cornwall, 2009).

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

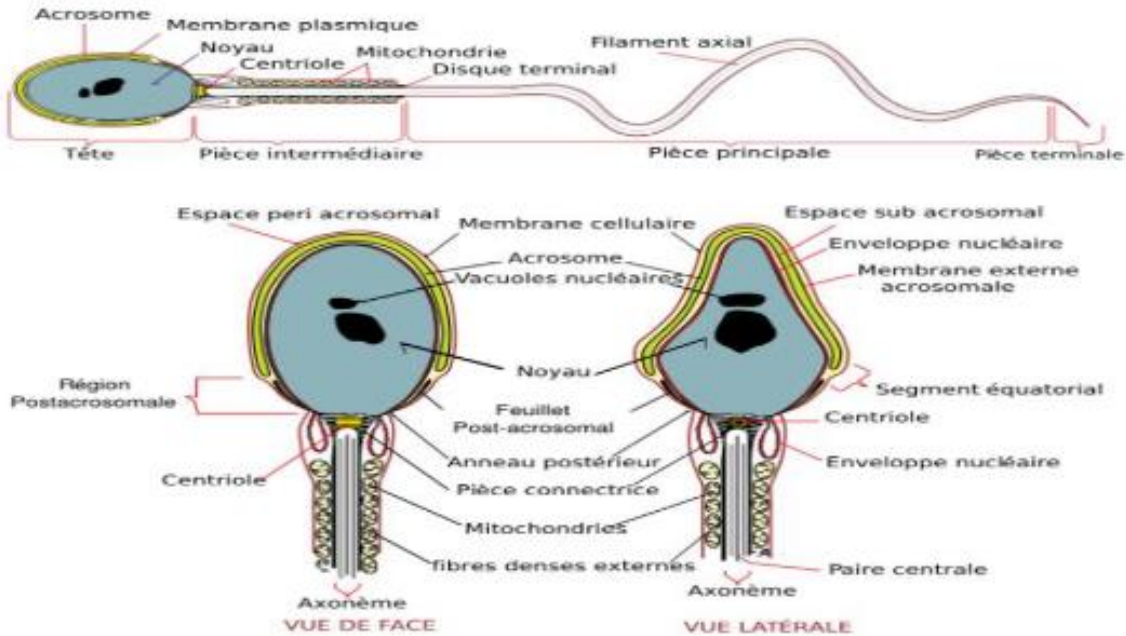


Figure 7 : Ultra structure du spermatozoïde humain. Schéma de la cellule en coupe longitudinale (Pei Ph, 2005).

### 1.6 Cytophysiologie de la spermatogenèse

L'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire régule la fonction des testicules. L'hypothalamus libère de la GnRH qui se lie à des récepteurs spécifiques de l'hypophyse antérieure, donnant le signal de sécréter FSH et LH. La FSH, associée à la testostérone (le principal androgène sécrété par les testicules), stimule le processus de spermatogenèse. L'un des nombreux effets de la FSH sur les cellules de Sertoli est de provoquer la libération d'acide lactique, un substrat préféré au glucose par les spermatocytes primaires, pour fournir l'énergie nécessaire au développement des cellules germinales. La LH agit sur les cellules de Leydig pour stimuler la biosynthèse de la testostérone (Liu et Handelsman, 2003).

Un diagramme de l'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire est présenté sur la Figure 8. La testostérone maintient la fertilité masculine grâce à son action sur les spermatozoïdes. La présence de récepteurs fonctionnels aux androgènes sur les cellules germinales est encore controversée aujourd'hui. Cependant, certaines études ont montré que l'expression de ces récepteurs est spécifique à l'état de développement des cellules germinales. Des techniques telles que l'immunofluorescence ont démontré la présence de récepteurs aux androgènes sur le sperme humain, suggérant qu'ils pourraient jouer un rôle précoce dans la spermatogenèse. La testostérone joue également un rôle dans la boucle de rétroaction en inhibant la sécrétion de LH et de GnRH respectivement par l'hypophyse et l'hypothalamus. L'inhibine est une glycoprotéine sécrétée par les cellules de Sertoli qui diminue la sécrétion de FSH. (Krester, 2007).

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

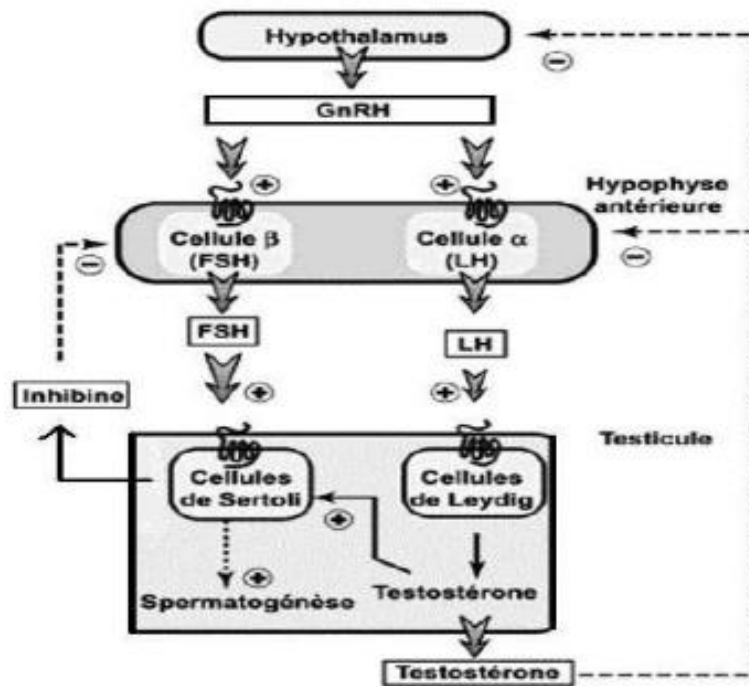


Figure 8 : Schéma des différentes composantes de l'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire (Quang Nhuon, 2002).

### 1.7 La capacitation

Il s'agit de la dernière acquisition de la capacité du SPZ à féconder l'ovocyte. En fait, la SPZ éjectée n'a pas été directement fertilisée (décapitée). Le pouvoir fécondant est acquis lors du transit par le tractus génital féminin, où la capacitation des spermatozoïdes a lieu par contact avec les fluides utérins et tubaires.

- ❖ **Le rôle du col utérin** : Seule la glaire cervicale permet à la SPZ de pénétrer dans le liquide séminal et de l'éliminer, car nombre de ses composants s'opposent au développement de la réaction de mucus nécessaire pour traverser la zone pellucide.
- ❖ **Les changements membranaires lors de capacitation**

En effet, il y a plusieurs changements :

- Dans les protéines membranaires et les glycoprotéines où les radicaux glucidiques sont fixés à la glycoprotéine, il s'agit d'une technique courante.
- En diminuant le rapport cholestérol/acides gras et en augmentant les phospholipides, les membranes peuvent être rendues plus résistantes aux dommages.



## **Chapitre 1 : Rappel Bibliographique**

- Sur la charge négative de la surface de la membrane plasmique.

### **❖ Conséquences des changements membranaires**

L'augmentation de la perméabilité au calcium entraîne une hyperactivation de l'amplitude du battement flagellaire et une modification de la trajectoire des SPZ. La mobilisation du calcium se produit en cycles courts appelés oscillations calciques. Une substance oscilline est responsable de cette mobilisation. La constitution de zones dépourvues de protéines où la fusion avec la membrane externe de l'acrosome aura lieu lors de la réaction acrosomique.

Seules les SPZ capables sont capables de traverser la masse de cellules folliculaires entourant l'ovocyte et d'entreprendre la réaction acrosomique qui leur permettra de perforer la zone pellucide.

## **1.8 Les étapes de la fécondation**

Le site habituel de fécondation est l'ampoule tubaire. Le processus de capacitation commence par l'activation des SPZ par les cellules folliculaires et se termine par le brassage des chromosomes au niveau de la plaque équatoriale. La fécondation dans l'espèce humaine comporte différentes étapes qui s'étalent sur une vingtaine d'heures.

### **1.8.1 La traversée du cumulus**

Pendant la période péri-ovulatoire, le nombre de SPZ présentes dans la trompe de Fallope est de quelques milliers. Seules quelques dizaines d'entre elles atteignent l'ovule. Les SPZ hyperactives qui entrent en contact avec les cellules folliculaires pénètrent immédiatement dans le gel hyaluronique. L'hyaluronidase libère une quantité d'enzyme capable de liquéfier la matrice intercellulaire.

L'action essentielle des cumulus est de ralentir les systèmes orageux pour éviter qu'ils ne se heurtent trop rapidement, ce qui augmenterait le risque de polyspermie.

### **1.8.2 L'interaction avec la zone pellucide**

#### **❖ L'adhésion SPZ-zone pellucide :**

La SPZ qui entre en contact avec la zone pellucide se fixe à sa surface et établit une liaison. C'est le composant hydrocarbure, ZP3, qui a une activité de récepteur vis-à-vis des protéines de la membrane plasmique de la tête SPZ, cette liaison est spécifique à l'espèce.

#### **❖ La réaction acrosomique :**

L'adhésion de SPZ à la zone pellucide déclenche la réaction acrosomique par la partie protéique de ZP3. L'acrosome est une structure lysosomale élargie chargée de diverses

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

enzymes hydrolytiques. La réaction acrosomique est la libération du contenu de l'acrosome dans le microenvironnement de l'ovocyte, processus essentiel à la pénétration de la SPZ dans la zone pellucide. L'afflux soudain de calcium provoque la fusion de la membrane externe de l'acrosome avec la membrane cellulaire SPZ.

La fusion des membranes conduit à la formation de vésicules membranaires mixtes. Ces vésicules se rompent alors, libérant les enzymes acrosomiques. La pénétration du calcium est également impliquée dans l'activation des enzymes de l'acrosome, en particulier la conversion de la pro-acrosine en acrosine.

La libération des enzymes de l'acrosome provoque la formation d'une cavité dans la zone pellucide où pénètre la tête de la SPZ, entraînée par les battements des flagelles, qui suivent une trajectoire oblique par rapport à la surface de l'œuf. L'acrosine modifie le maillage protéique de la zone pellucide, qui à son tour a un effet relaxant. Cela facilite le passage du sperme.

### **1.8.3 La fusion des gamètes**

Le premier spermatozoïde qui traverse la zone pellucide pénètre dans l'espace périvitellin, atteint tangentiellement la surface de l'ovocyte et fusionne immédiatement avec lui (plasmogamie). La 1<sup>ère</sup> étape correspond à la fusion de la membrane ovocytaire avec la membrane plasmique de la coiffe post acrosomique de la SPZ.

### **1.8.4 L'activation de l'ovocyte**

La mobilisation du calcium à l'intérieur des cellules déclenche la réaction corticale et l'activation du cytoplasme :

- ❖ **La réaction corticale :** Les granules corticaux fusionnent avec la membrane cytoplasmique et, par exocytose, libèrent leurs enzymes hydrolytiques dans l'espace périvitellin, entraînant des modifications physico-chimiques de la zone pellucide, la rendant imperméable aux autres SPZ, assurant ainsi la monospermie (**Figure 9**).
- ❖ **L'activation du cytoplasme :** La reprise de la méiose se traduit par la production d'un second globule polaire et d'un pronucléus femelle haploïde (n).

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

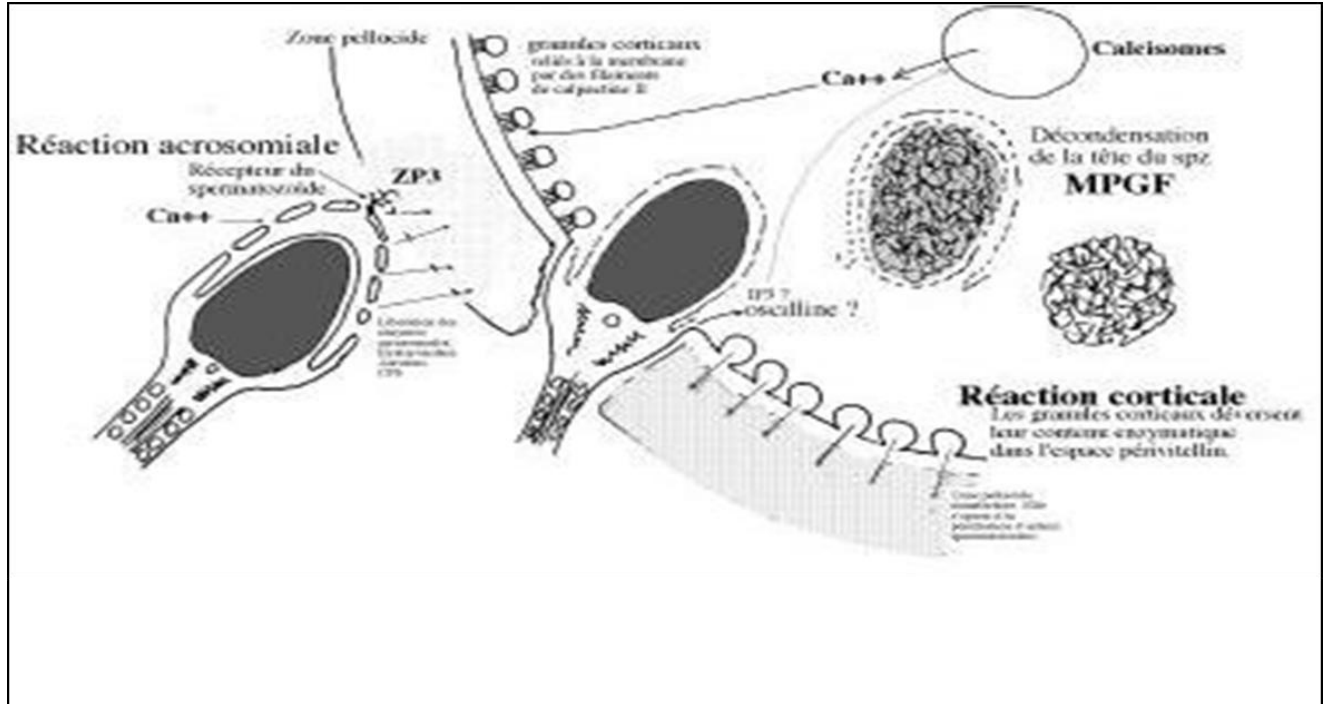


Figure 9 : La réaction corticale (Alain, 2016).

### 1.8.5 L'incorporation et la transformation du spermatozoïde (SPZ)

Au fur et à mesure que la méiose se termine, la SPZ est complètement engloutie et son noyau remodelé.

- ❖ **Fusion des membranes** : La fusion entre la membrane plasmique de la SPZ et la membrane vitelline procède étape par étape jusqu'à englober toute la SPZ, y compris le flagelle. À l'exception du noyau et des mitochondries, tous les composants du SPZ sont détruits par les lysosomes.
- ❖ **Disparition de l'enveloppe nucléaire** : En une heure environ, l'enveloppe nucléaire se dissout et la chromatine est décondensée sous l'action de plusieurs facteurs ovocytaires, comme le MPG. Une nouvelle enveloppe nucléaire qui détermine le pronoyau est installée.

### 1.9 La restauration de la diploïdie

La constitution des spermatozoïdes (sperme) a lieu environ 12 heures après la pénétration de la SPZ. Le noyau femelle forme un pronucléus femelle après avoir réhydraté sa chromatine. Par conséquent, le noyau du spermatozoïde se transforme en un pronucléus mâle. Après la rupture de la membrane, le traitement de la chromatine et la formation d'une nouvelle membrane.

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

Les deux pronucléi se rapprochent du centre de l'œuf. La rupture des membranes des 2 pronoyaux entraîne l'arrangement des chromosomes décondensés sur le fuseau mitotique.

La fécondation est terminée lorsque la chromatine des deux gamètes est reliée par des liaisons achromatiques du plateau mitotique. (**Figure 10**).

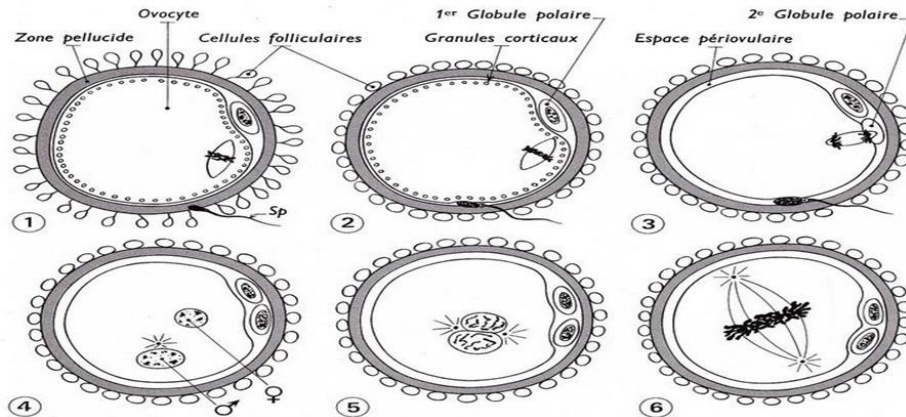


Figure 10 : Les étapes de la fécondation (Patrick Villette, 2012).

## 2 Les différentes causes de l'infertilité masculine

### 2.1 Anomalies de l'éjaculation

- **Impuissance** ou échec à l'éjaculation : L'impuissance, ou dysfonction érectile, est l'incapacité d'obtenir ou de maintenir une érection suffisamment longtemps pour qu'un rapport sexuel ait lieu (Godwin, 2004).
- **Éjaculation prématurée** : L'incapacité du patient à contrôler le moment de l'éjaculation pour permettre à son partenaire d'atteindre l'orgasme (Nieschlag et al., 2010).
- **Éjaculation rétrograde** : Les sphincters de la vessie sont fermés au moment de l'éjaculation, empêchant le sperme de retourner dans la vessie. Des maladies telles que le diabète et la sclérose en plaques peuvent altérer la fermeture de ces sphincters, entraînant une éjaculation rétrograde (Godwin, 2004).
- **Éjaculation extra-vaginale** : Le dépôt de sperme extra vaginal peut se produire non seulement dans l'éjaculation précoce, mais aussi chez les hommes souffrant d'hypospadias ou d'hypospadias sévères. Dans ce dernier cas, l'ouverture de l'urètre n'est pas à l'extrémité du pénis, mais quelque part le long de la tige du pénis en raison de l'échec du développement du reste de l'urètre. (Godwin, 2004).

### **2.2 Cause immunologique**

Les anticorps anti-spermatozoïdes réduisent la capacité de fertilisation des spermatozoïdes par plusieurs mécanismes, y compris l'inhibition de la migration des spermatozoïdes à travers le mucus cervical. Par la suite, des anticorps de la classe IgG se retrouvent dans le sang et dans le plasma séminal, qui se lie fortement aux spermatozoïdes (**Rizk et al., 2008**).

### **2.3 Anomalies Congénitales**

La cryptorchidie, en particulier si elle est bilatérale, est associée à une infertilité due à l'oligozoospermie ou à l'azoospermie (**Rizk et al., 2008**). Une telle obstruction peut être provoquée par le blocage de l'épididyme ou l'absence congénitale des deux conduits déférents (**Godwin, 2004**). L'hypogonadisme hypo-gonadotrope congénital est associé avec l'anosmie dans le Kallmann, qui est habituellement détecté à l'âge de puberté (**Rizket al., 2008**).

### **2.4 Infection des glandes annexes**

Les glandes accessoires peuvent être infectées par les organismes qui causent les maladies sexuellement transmises telles que la gonorrhée, la syphilis, la chlamydie et l'urétrite non spécifique (**Godwin, 2004**). Les effets des IAGM sur la capacité de fertilisation de spermatozoïdes peut être par : le volume diminué de l'éjaculat et/ou la viscosité accrue et la composition biochimique anormale du fluide séminal, la mobilité et concentration faible de spermatozoïdes (**Rizk et al., 2008**).

### **2.5 Les leucocytes**

En plus des spermatozoïdes immatures et anormaux, les leucocytes sont la source majeure des ROS et du stress oxydatif (**Aitken et West, 1990**), (**Whittington et Ford, 1999**). Un faible nombre de leucocytes sont présents dans la majorité des éjaculats normaux. Des études ont démontré une corrélation entre la leucocytospermie et l'altération d'ADN spermatique (**Alvarez et al, 2002**). La varicocèle résulte de la pression hydrostatique accrue dans le plexus pampiniforme intra-scrotale et dans les veinules testiculaires (**Rizk et al., 2008**). Le mécanisme exact par lequel la varicocèle influence la fertilité reste peu clair.

### **2.6 Cause Iatrogénique**

- **Médicaments** : La production des spermatozoïdes dans les testicules peut être diminuée par certains médicaments : des hormones, la sulfasalazine, la cimétidine, la nitrofurantoïne, la niridazole, la spironolactone et la colchicine (**Rowe et al, 1993**), (**Rowe et al., 2000**).

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

- **Intervention chirurgicale** : L'infertilité peut être un résultat d'une complication de certaines opérations, telles que la prostatectomie, et des opérations sur les voies génitales masculines pendant l'enfance (**Godwin, 2004**).

### **2.7 Radiothérapie**

Les irradiations qui intéressent la zone du bassin peuvent léser de manière plus ou moins importante la fonction testiculaire et peuvent alors entraîner une altération de la spermatogénèse voire son arrêt (**Rowley, 1974**) :

- < À 0,1 Gy : sans effet.
- 0.15 à 0.5 Gy : oligozoospermie très sévère.
- 0.5 à 0.8 Gy : azoospermie réversible (1an).
- > 0.8 Gy : azoospermie réversible avec élévation de FSH et de LH (2 ans, 50%).
- 4-6 Gy : azoospermie irréversible.

### **2.8 Chimiothérapie**

Ayant une action sur le cycle mitotique cellulaire, sa répartition est très variable selon le type de produit utilisé ainsi que la dose totale prescrite.

- Alkylants : Cyclophosphamide, chlorambucil, busulfan...etc.
- Sels de platine : Cisplatine, carboplatine.
- Antagoniste des folates : Méthotrexate.

La dose et la durée du traitement : l'azoospermie est rarement réversible après 400 mg de chlorambucil, 6 à 10 g decyclophosphamide...etc (**Baudino et al., 2012**).

### **2.9 L'Obésité**

Dans la plupart des études menées chez des couples infertiles, on observe une incidence plus élevée de l'obésité chez l'homme en cas d'infertilité masculine. Plus le BMI de l'homme est élevé et moins il y aurait de chances de grossesse en FIV (**Keltz et al., 2010**). Au niveau des gamètes, plus le BMI de l'homme augmente plus le risque de présenter une oligozoospermie ou une azoospermie est élevée. Plus le BMI de l'homme est élevé et plus il y a un risque d'ADN spermatique fragmenté, élément associé à un risque accru de moindre fécondance et de fausse couche (**Dupont et al., 2013**).

### **2.10 Le tabagisme**

Le tabac de la cigarette contient une forte concentration de ROS y compris O<sup>2</sup> et OH, il a été démontré sa participation dans la réaction de Fenton et la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et cause l'endommagement de l'ADN (**Valavanidis et al., 2009**). La nicotine est oxydative et peut entraîner la cassure de doubles brins d'ADN dans l'ADN spermatique In vitro. La cotinine, est un métabolite majeur, elle est détectée dans le plasma séminal des fumeurs (**Wong et al., 2000**).

### **2.11 L'Alcool**

La consommation aigue ou chronique d'alcool peut aussi affecter la fertilité masculine. Il est bien documenté que l'éthanol supprime l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire entraînant ainsi une diminution importante des hormones essentielles à la production des spermatozoïdes (**Gordon et al., 1976**), (**Ren, 2005**).

### **2.12 La chaleur**

La position de scrotum agit d'une façon à maintenir la température des testicules plus basse de celle dans le corps. L'élévation de la température dans le scrotum, ou l'hypothermie, est associée à l'infertilité masculine et l'altération de la spermatogenèse. L'arrêt de la spermatogenèse augmente le nombre des spermatozoïdes immatures ou des spermatozoïdes dans l'épididyme et l'éjaculat, et ce sont des sources majeures de ROS (**Gil-Guzman et al., 2001**), (**Ollero et al., 2001**).

### **2.13 Infertilité Idiopathique**

Dans environ 25% des partenaires masculins dans les couples infertiles il n'y a aucune cause avérée pour expliquer les mauvais paramètres du sperme (**Godwin, 2004**).

## **3 ADN Spermatique**

La reproduction chez l'homme se caractérise par la production d'un grand nombre de spermatozoïdes par le processus de spermatogenèse. Cela peut être affecté par la normalité phénotypique des gamètes et leur intégrité génomique (**Aitkenet Krausz, 2001**). La formation de spermatozoïdes matures est un processus unique impliquant une série de méiose et de mitose, des modifications de la structure du cytoplasme, le remplacement des histones somatiques par des protéines de transition et enfin l'ajout de protamine, qui conduit à un compactage dense de la chromatine (**Kumaroet al., 1975**) ; (**Goldberg et al., 1977**) ; (**Poccia, 1986**).

### **3.1 Structure d'ADN**

La structure du nucléosome a été remarquablement conservée au cours du temps. La structure cristallographique de sa particule centrale a été déterminée pour plusieurs espèces à des résolutions allant jusqu'à 1,9Å (**Chantalat et al., 2003**) ; (**Clapier et al., 2008**) ; (**Luger et Richmond, 1998b**) ; (**Tsunaka et al., 2005**) ; (**White et al., 2001**) ; (**Luger et al., 1997**).

L'ADN d'une cellule humaine est composé de 146 paires de bases et il faut 1,65 tours autour de l'octamère protéique pour faire un tour complet. L'ADN est maintenu par 116 liaisons hydrogène directes avec des histones situées à 14 endroits spécifiques sur la particule (**Luger et Richmond, 1998b**).

Les queues d'histones N-terminales, flexibles, ne sont pas définies dans la structure cristallographique, à l'exception de la queue H4, qui établit une interaction avec le dimère H2A-H2B appartenant au nucléosome voisin et est ainsi stabilisée. Ces queues portent de nombreux sites de modifications post-traductionnelles, qui ensemble transmettent des informations épigénétiques importantes (**Luger et Richmond, 1998a**).

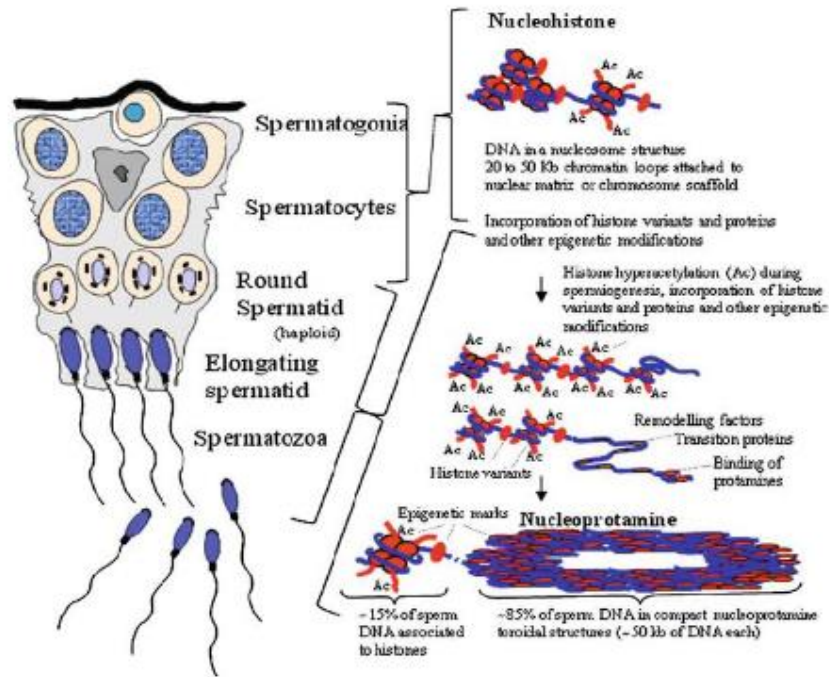
### **3.2 Structure de la chromatine spermatique**

La chromatine des spermatozoïdes est organisée en une structure compacte et cristalline avec de l'ADN haploïde et des protéines hétérologues, et ce niveau élevé de condensation et d'insolubilité joue un rôle protecteur lors du transfert du matériel génétique mâle dans les voies reproductives mâles et femelles (**Tateno et al., 2000**).

La condensation finale de l'ADN est six fois plus forte que dans le cas des chromosomes mitotiques des cellules somatiques. Les histones sont acétylées avant d'être remplacées par de petites protéines de transition. Ces protéines seront remplacées par des protamines (**Meistrich et al., 2003**) (**Figure 11**). Ce facteur est nécessaire pour que le sperme soit le plus mobile possible et implique que la cellule puisse temporairement fonctionner sans ADN nucléaire (**Kimura et Yanagimachi, 1995**) ; (**Ogura et al., 1994**).



## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique



**Figure 11 : Schéma représentatif des changements cellulaires et chromatique majeurs qui se produisent durant la spermatogénèse (Cheung et al., 2009).**

Cette condensation est spécifiquement destinée à la fécondation et n'est pas nécessaire pendant le développement embryonnaire. Il est important de comprendre le mécanisme de compactage de l'ADN du sperme et sa différence avec les cellules somatiques ; La compression s'effectue sur 4 niveaux (Hud et al., 1993, 1994) ; (Brewer et al., 1999, 2003) ; (Vilfan et al., 2004) :

- L'unité fondamentale de compactage de l'ADN du sperme chez les mammifères est le toroïde (Figure 13). La liaison des protamines neutralise la charge négative de la double hélice d'ADN. La protamine contient des cystéines qui favorisent la stabilité des chromosomes du sperme (Ballhorn, 1982) ; (Prieto et al., 1997).
- Contrairement aux autres mammifères dont le sperme contient un type de protamine (p1), la rétention de 15 % d'histones induit une formation moins compacte, mais l'homme et la souris sont dépourvus de résidus de cystéine. Il existe un deuxième type de protamine (p2). Les modifications du rapport p1 / p2 ou l'absence de p2 sont associées à des problèmes d'infertilité. (Corzett et al., 2002).
- L'attachement des protamines à l'ADN conduit à moins de surenroulement par rapport aux histones. Les histones enroulent l'ADN tous les 100 bp, mais les protamines enroulent l'ADN tous les 600 bp ou plus, donc plus compactes mais moins enroulées (Ward, 1993) ; (Ward et al., 1989).
- La position et le rôle de ce résidu d'histone restent controversés, certains auteurs démontrant une localisation dans les télomères (Gineitis et al., 2000), (Zalensky et al., 2002), tandis que d'autres suggèrent le site de la boucle d'ADN. Cependant, la chromatine

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

des spermatozoïdes associée aux histones reste un candidat pour les dommages à l'ADN (Pittoggi et al., 2000), (Wykes et Krowetz, 2003).

Grâce aux complexes de remodelage ATP-dépendants et aux domaines de reconnaissance, la chromatine est capable de recruter, de manière précise et temporellement contrôlée, les facteurs qui assurent son remodelage. Ces derniers assurent le remplacement des histones canoniques par des variants, et des enzymes responsables de l'ajout ou de la suppression des facteurs de remodelage ATP-dépendants (Peterson, 2000).

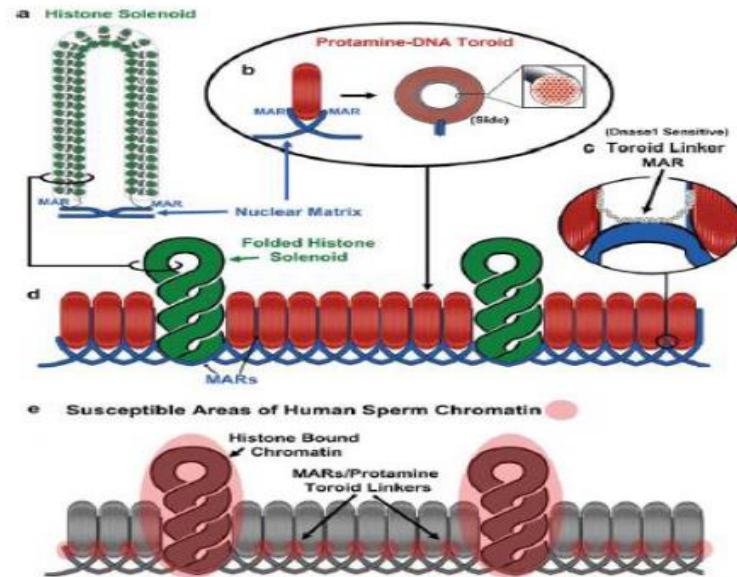


Figure 12 : Un modèle de la structure de la chromatine spermatique chez l'Homme (Ward, 2010).

### 3.3 Le rôle de la condensation de la chromatine spermatique

La condensation des spermatozoïdes permet le transfert complet d'informations génétiques très serrées vers l'ovule. Il garantit que l'ADN est livré sous une forme physique et chimique afin que l'embryon en développement puisse accéder à l'information génétique (Sakkas et al., 1999).

Cette condensation nucléaire protège le génome du sperme des dommages potentiels :

- Les contraintes externes telles que l'oxydation ou l'augmentation de la température qui peuvent être produites lors du voyage des spermatozoïdes dans les voies génitales masculines et féminines peuvent avoir un impact sur la fertilité (Kosower et al., 1992).
- Les nucléases (Sotolongo et al., 2003) et la sonication (Tateno et al., 2000) peuvent réduire de 85 % le nombre de spermatozoïdes à chromatine condensée, mais jusqu'à 15 % de l'ADN du sperme peut encore être emballé par des histones et des télomères. (Gatewood et al., 1987) ; (Gineitiset al., 2000).

### 3.4 La relation entre la structure chromatinique et l'altération d'ADN chez les spermatozoïdes des mammifères

La majeure partie de la chromatine du sperme est conditionnée dans un état presque cristallin, donnant l'impression que toute activité normale de la chromatine sera exclue par cette transcription silencieuse cellulaire non répliquative. Cependant, des études récentes ont montré que la modification de la machinerie DNase reste active et que H2AX peut être phosphorylé en  $\gamma$ -H2AX en réponse à un traitement mutagène ou au peroxyde (Berling et Wolner hansen, 1997), (Carlsen et al., 1992).

Aitken et Iulius suggèrent que le compactage serré des protéines histones et la capacité à détecter les ruptures de brins d'ADN dans les échantillons de sperme avec cet épuisement des histones sont fascinants. La chromatine de cette cellule est inerte, mais une fois endommagée, elle doit attendre la fécondation avant de pouvoir être réparée (Figure 13). La voie de réparation de l'ADN est activée une fois les dommages détectés, qui implique l'activation de la voie de signalisation gamma H2AX (Templeton, 1995).

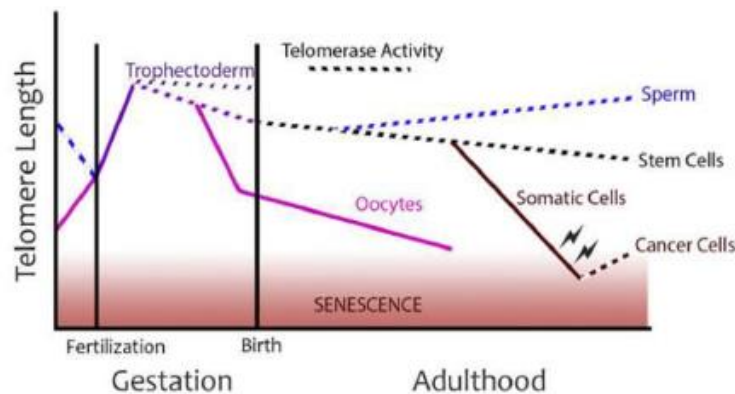


Figure 13 : Schéma représentatif de la relation entre la longueur des télomères et le développement chez les mammifères (Kalmbach et al., 2013).

### 3.5 Les télomères et la reproduction masculine

Les télomères sont des brèves, paires répétées d'ADN qui limitent les terminaisons linéaires de chromosome par la liaison des protéines complexes de Shelterin à des boucles protectrices des télomères. Un nombre insuffisant de télomère répété induit à l'altération chromosomique, la sénescence cellulaire, et la mort. Après la fécondation, les télomères spermatiques sont le premier site dans le génome spermatique à répondre au signal de l'ovocyte pour la formation de pro-noyau et le mouvement guidé des microtubules (Thilagavathi et al., 2012).

La longueur des télomères dans le sperme humain se produit grâce à une action continuée de télomérase, qui est exprimée à des niveaux élevés dans les spermatogonies. Toutefois, le

## **Chapitre 1 : Rappel Bibliographique**

maintien de la longueur moyenne des télomères spermatiques, est variable d'un individu à l'autre et d'un spermatozoïde à l'autre chez un même individu, cette variation de la longueur des télomères spermatique peut être le résultat d'une variabilité de l'activité télomérase et/ou des effets du stress oxydatif, qui réduit la longueur des télomères, et réduit la fertilité (**Santiso et al., 2010**), (**Baird et al., 2006**).

### **3.6 Fragmentation de l'ADN spermatique**

La fragmentation de l'ADN fait référence aux cassures et aux lésions du matériel génétique du sperme, particulièrement fréquentes dans la population masculine subfertile (**Irvine et al., 2000**). Il ne s'agit pas d'une mutation, mais d'un changement pro-mutagène qui peut générer des mutations chez la progéniture en cas de réparation inadéquate ou défectueuse. Le principal impact de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes concerne les grossesses et les fausses couches, et non le développement embryonnaire précoce, y compris la fécondation.

#### **3.6.1 Fragmentation d'ADN pendant la spermiogénèse**

Les lacunes d'ADN endogènes sont normalement présentes à des stades spécifiques de la production de sperme chez les rats et les souris, et on pense qu'elles ont une signification fonctionnelle (**Sakkas et al., 1999**). La présence d'espaces est la plus grande lors de la transition des spermatides ronds aux spermatides ovales dans le testicule et se produit avant l'achèvement de la protamination dans le sperme en maturation chez les rats et les souris (**McPherson et Longo, 1992**), (**Sakkas et al., 1995**).

McPherson et Longo (**1992, 1993a, b**) ont émis l'hypothèse que la présence de lacunes dans l'ADN du sperme éjaculé pourrait indiquer une maturation incomplète au cours de la spermatogénèse. Ils ont émis l'hypothèse que la condensation de la chromatine peut nécessiter une activité nucléase endogène pour créer et combler les lacunes qui facilitent la protamination. On pense que ces lacunes fournissent un moyen de détordre l'ADN afin qu'il puisse être réarrangé lors du déplacement des histones par les protéines et on pense que le même processus se produit chez l'homme (**Marcon et Boissonneault, 2004**). L'activité enzymatique impliquée dans la création de cassures d'ADN dans les spermatozoïdes n'a été prouvée que pour la topoisomérase II qui produit et ligature des fragments double brin (**McPherson et Longo, 1993**).

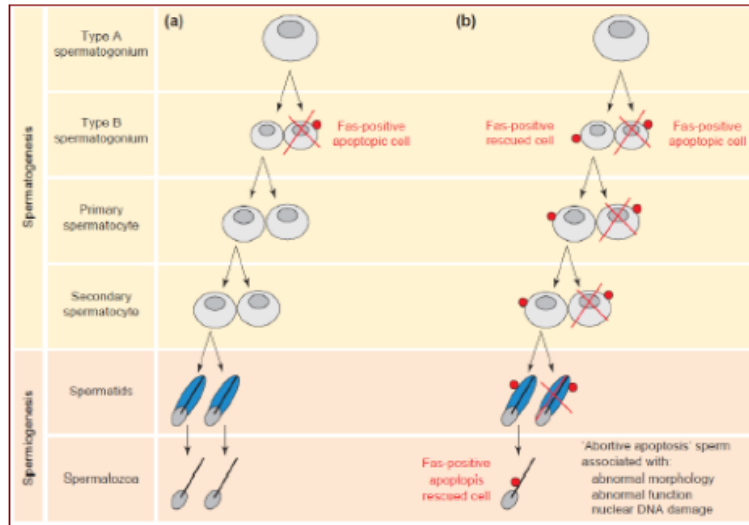
#### **3.6.2 Les différentes causes de fragmentation d'ADN spermatique**

##### **❖ Apoptose cellulaire**

L'apoptose est importante dans la vie des cellules germinales au cours du développement précoce, elle assure un rapport optimal des cellules de Sertoli aux cellules germinales (**Figure 15**). Cette régulation est similaire à la différenciation des gonades chez la femme. À l'âge adulte, l'apoptose joue également un rôle important en éliminant sélectivement diverses

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

cellules endommagées. L'apoptose survient le plus souvent au stade pachytène des spermatogonies, médiée par le système Fas/FasL (Suda et al,1993)



**Figure 14 :** Le rôle de Fas pendant la spermatogenèse chez l'homme avec les paramètres spermatiques (a) normaux et (b) anormaux (oligospermiques, asthénospermiques et tératospermique) (Sakkas et al., 1999).

La liaison d'un anticorps anti-Fas agoniste (FasL) à cette molécule de surface tue les cellules par apoptose (Suda et al., 1993). Il a été démontré chez la souris et le rat que les cellules de Sertoli normales expriment FasL et signalent la destruction. Cellules germinales Fas-positives en limitant la taille de la population de cellules germinales au nombre qu'elles peuvent supporter (Lee et al., 1997).

Des spermatozoïdes Fas-positifs peuvent également survenir à la suite de problèmes d'activation de l'apoptose médiée par Fas. Ces problèmes peuvent être dus à un manque de synchronisation entre l'apoptose et la spermatogenèse (Sakkas et al., 1999). Dans ce cas, même si l'apoptose est initiée, les cellules germinales atteignent la spermiogénèse. Ainsi, on pense que la différenciation des cellules germinales haploïdes subit une forme restreinte d'apoptose, conduisant à la fragmentation de l'ADN dans le noyau tout en conservant la capacité de se différencier en spermatozoïdes matures fonctionnels.

### ❖ Fragmentation de l'ADN spermatique post-testiculaire

Une caractéristique importante qui ressort d'études récentes est que le niveau de fragmentation de l'ADN dans le sperme éjaculé est généralement plus élevé que dans le sperme testiculaire (Steele et al.,1995), et dans le sperme du corps et de la tête de l'épididyme, où se déroule exactement le processus de formation de la liaison disulfure et que l'induction de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes pourrait être dans l'épididyme liée à leur qualité génomique (Sakkas et al.,2010). C'est-à-dire qu'en plus du mécanisme de tri qu'exercent les

## **Chapitre 1 : Rappel Bibliographique**

cellules de Sertoli lors de la spermatogenèse, il existerait un autre mécanisme de criblage au niveau de l'épididyme qui servirait à éliminer les spermatozoïdes avec un génome défectueux (**Suganuma et al., 2005**).

Les dommages potentiels que les spermatozoïdes peuvent subir lors de leur passage dans l'épididyme peuvent être limités en les éliminant avant ce passage (**Sakkas et al., 2010**).

### **❖ Stress oxydatif**

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle dans la régulation des activités des gènes et des protéines essentielles au fonctionnement des spermatozoïdes. Le sperme d'hommes fertiles contient des antioxydants qui aident à contrôler la quantité de ROS générée. Lorsque les niveaux de ROS sont élevés, ils peuvent causer des dommages. 30 à 80 % de l'infertilité masculine est causée par des dommages causés par le stress oxydatif. Le plasma séminal est riche en antioxydants qui peuvent aider à protéger et à nourrir les spermatozoïdes. La membrane plasmique du sperme est riche en acides gras insaturés et est sensible aux dommages oxydatifs. (**Palermo et al., 2014**).

Des études récentes ont montré que l'exposition de spermatozoïdes immatures à des niveaux élevés de ROS peut endommager l'ADN des spermatozoïdes matures. Les ROS peuvent endommager directement ou indirectement l'ADN des spermatozoïdes en activant les caspases et les endonucléases des spermatozoïdes (**Sakkas et al., 2010**). À des niveaux élevés, les ROS sont impliqués dans trois sources majeures d'anomalies structurelles de la chromatine : l'activité topo II anormale, l'apoptose et la nécrose (**Evenson et al., 2002**).

Les spermatozoïdes et les leucocytes de forme anormale sont la principale cause de la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène dans le sperme. La production de ROS peut être augmentée de 20 à 50 fois avec des étapes de centrifugation répétées. De plus, la préparation du sperme pour l'ART entraîne une production incontrôlée de ROS lorsque les spermatozoïdes sont libérés du plasma séminal, éliminant ainsi les ROS/réductase produites par la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion. L'enzyme peroxydase catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (**Aitken et al., 1992**).

### **❖ Fragmentation d'ADN induite par Chimiothérapie et radiothérapie**

Il est généralement connu que les traitements contre le cancer peuvent entraîner une réduction de la production de spermatozoïdes, en raison des effets cytotoxiques de la chimiothérapie ou de la radiothérapie sur l'épithélium spermatogénèse (**Morris et al., 2002b**).

### **❖ Les endommagements d'ADN induits par les toxines environnementales**

Au moins cinq types de produits chimiques environnementaux connus pour être omniprésents dans l'environnement d'aujourd'hui peuvent être associés à un stress oxydatif

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

dans les spermatozoïdes ou à des dommages à l'ADN des spermatozoïdes (**Barratt et al., 2010**).

### ❖ Les pesticides

Il y a eu au moins sept études évaluant l'impact des pesticides sur les dommages à l'ADN des spermatozoïdes au cours des 15 dernières années, dont quatre faisant état d'une association positive (**Barratt et al., 2010**).

### ❖ Les phtalates

Les phtalates sont utilisés dans les emballages alimentaires, les soins personnels et les produits en plastique (**Barratt et al., 2010**).

Dans un groupe de 379 couples masculins hypofertiles qui se sont présentés dans des cliniques d'infertilité, les niveaux de deux métabolites spécifiques du phtalate ont été associés à un pourcentage élevé d'ADN avec la queue de la comète en utilisant le test neutre de Comète (utilisée pour mesurer les cassures de brins d'ADN dans les cellules eucaryotes) (**Hauser et al., 2007**).

Des études récentes montrent que les spermatozoïdes immatures, qui sont soumis à des niveaux élevés de ROS, peuvent induire des dommages à l'ADN des spermatozoïdes matures. Après spermiation, ces dommages seraient produits lors de la comigration des spermatozoïdes matures et immatures des tubules séminifères vers la queue de l'épididyme (**Ollero et al., 2001**). Les ROS peuvent endommager directement ou indirectement l'ADN des spermatozoïdes en activant les caspases et les endonucléases des spermatozoïdes (**Sakkas et Alvarez, 2010**).

À des niveaux élevés, les ROS sont impliqués dans les trois sources de structure anormale de la chromatine : activité topo II anormale, apoptose et nécrose (**Evenson et al., 2002**). Les spermatozoïdes morphologiquement anormaux (en particulier avec des restes cytoplasmiques) et les leucocytes sont la principale source de génération excessive de ROS dans le sperme

Au cours des étapes de centrifugation répétées, la production de ROS peut être augmentée de 20 à 50 fois. De plus, la préparation de sperme ART peut conduire à une production non régulée de ROS lorsque les spermatozoïdes sont séparés du plasma séminal, éliminant ainsi la protection antioxydante du plasma séminal par la superoxyde dismutase, la catalase et la peroxydase. Glutathion et réductase (**Aitken et Clarkson, 1988**).

### ❖ Les polychlorobiphényles

Les biphényles polychlorés (PCB) sont un type de polluant organique persistant (**Barratt et al., 2010**). Les effets des PCB sur l'intégrité de l'ADN du sperme à l'aide du SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay, voir ci-dessous) ont récemment été démontrés dans des études

## Chapitre 1 : Rappel Bibliographique

épidémiologiques sur des populations européennes et inuites (Spano et al., 2005) ; (Long et al, 2007) et sur des pêcheurs suédois Rignell-Hydbom et al., 2005).

### ❖ Les métaux

Deux études épidémiologiques ont suggéré que les métaux non essentiels peuvent endommager l'ADN des spermatozoïdes (Barratt et al., 2010). Les dommages à l'ADN des spermatozoïdes induits par le stress oxydatif ont été corrélés avec le cadmium dans le plasma séminal chez 56 participants non-fumeurs dans une étude menée en Chine (Xu et al., 2003).

### ❖ La pollution atmosphérique

La pollution de l'air due à la combustion du charbon a été associée à une fragmentation accrue de l'ADN du sperme mesurée par SCSA dans une étude longitudinale de 36 hommes de la République tchèque (Rubes et al., 2005).

(Rubes et al., 2007) prolongent ces observations et abordent l'hypothèse selon laquelle les humains homozygotes dépourvus de glutathion-S-transférase M1 pourraient être moins capables de détoxifier les métabolites réactifs des hydrocarbures aromatiques polycycliques cancérigènes présents dans la pollution de l'air et, par conséquent, ces hommes seraient plus susceptibles à l'infection malade. Effets de la pollution de l'air sur la chromatine des spermatozoïdes.

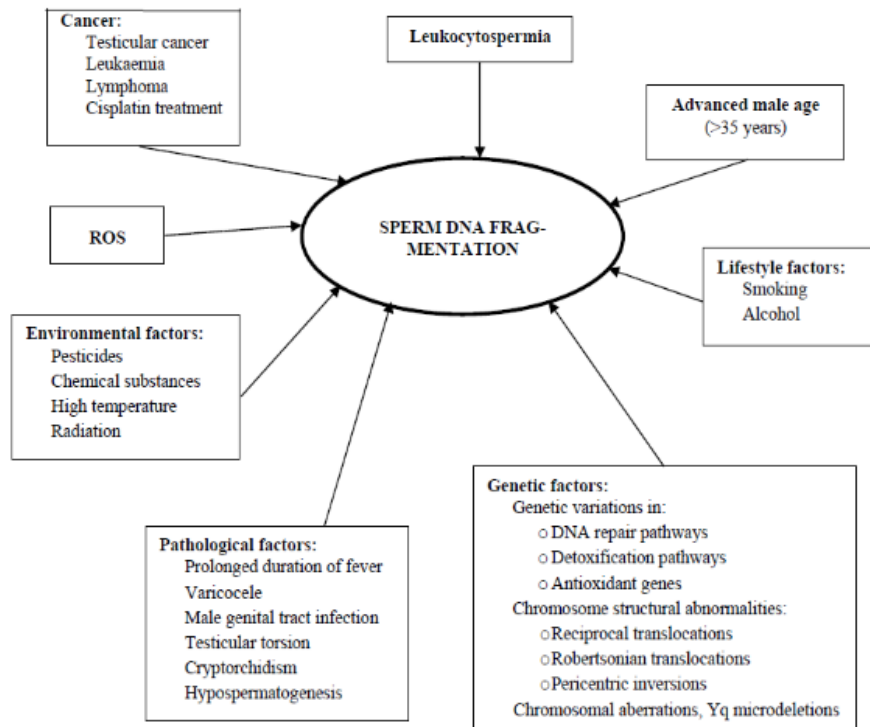


Figure 15 : Les facteurs majeurs de fragmentation d'ADN spermatique (Shamsi et al., 2012).



# **CHAPITRE 2**

## **Matériels et Méthodes**

## **1 Critères de base dans le choix des articles**

Dans le but de répondre à la problématique aborder dans notre thèse nous avons dû mener une étude d'analyse de 20 articles traitant les causes sous-jacentes de l'augmentation de la production de ROS et des mécanismes par lesquels le stress oxydatif se développe chez les hommes infertiles.

Ainsi, nous avons dû faire nos recherches en ligne, ce qui nécessite d'utiliser des moteurs de recherche et des mots-clés associés à notre thème. Le tableau ci-dessous présente la nature de notre documentation scientifique :

	<b>Nature des données</b>
<b>Les Moteurs de recherche</b>	Google Scholar.
	Le Système National de Documentation en Ligne (SNDL).
	Springer Link.
	ScienceDirect.
	Human Reproduction.
<b>Les mots clé</b>	ROS – ADN – Infertilité.
<b>La langue</b>	Français – Anglais.
<b>L'année de publication</b>	2000 – 2020.
<b>Nombre d'article</b>	Totales : 35 Articles.
	Inclus : 20 Articles.
	Exclus : 15 Articles.
<b>Méthode de travail</b>	Visualisation des données en forme d'histogrammes.

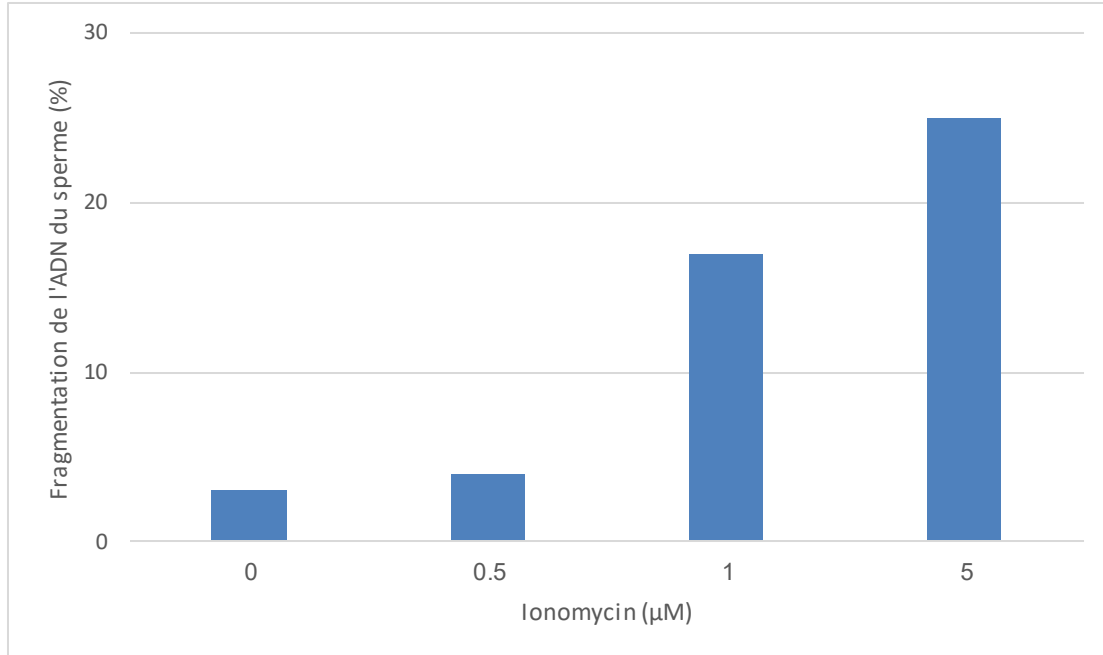
**Tableau 1 : Présentation de la nature de données utiliser durant la recherche.**

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

	Type de stress oxydatif	Nombre d'article	Références des articles
<b>Motilité</b>	MDA (Peroxydation lipidique)	4	(Barroso et al., 2000)
			(Iommiello et al., 2015)
			(Elbardisi et al., 2020)
			(Bellver et al., 2010)
	Leucocyte (Inflammation)	5	(Hosen et al., 2015)
			(Ajayi et al., 2020)
			(Avendano et al., 2012)
			(Zribi et al., 2011)
			(Pérez-Cerezales et al., 2009)
	H2O2 (ROS)	1	(Lemkecher et al., 2005)
Cypoconversion	2	(Lobascio et al., 2015)	
		(Fatima et al., 2020)	

**Tableau 2 : Répartition des articles analysés et leurs références.**

## **2 Transition de perméabilité mitochondriale augmente la production de ROS qui induit la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes humains**



**Figure 16 : mPTP : Les effets de l'ouverture de mPTP sur la fragmentation de l'ADN dans des spermatozoïdes humains (Treulen et al., 2015).**

### **❖ Interprétation :**

Les effets de l'ouverture de mPTP (Mitochondrial permeability transition pore) sur la fragmentation de l'ADN dans des spermatozoïdes humains incubés à 37°C pendant 2 heures avec 0,5, 1 ou 5 µM d'ionomycine ou non traités comme contrôle ont été examinés. Les valeurs représentent la moyenne + SD de cinq expériences distinctes. (P <0,001 par rapport aux témoins non traités.)

### **❖ Discussion :**

Le stress oxydatif est une cause majeure d'infertilité chez les hommes, comme en témoignent l'augmentation de la fonction des spermatozoïdes et la fragmentation de l'ADN (Aitken et al., 2012). En plus de la production exogène de ROS par infiltration leucocytaire (Aitken et West, 1990) ; (Aitken et al., 1992), les spermatozoïdes sont une source de ROS endogènes de deux manières : via le système NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate<sup>o</sup> oxydase représentent la membrane plasmique et dans les mitochondries via le système NADH oxydoréductase (Aitken et al., 1992) ; Gavella et Lipovac, 1992) ; (Agarwal et al., 2003).

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Il a également été suggéré que les spermatozoïdes produisent des ROS excessifs lorsqu'ils résultent d'une spermatogenèse défectueuse, entraînant une rétention excessive de cytoplasme (Zini et al., 1993) ; (Gomez et al., 1996). Cependant, la production de ROS par MPT dans le sperme humain et ses effets sur le DCM (Mitochondrial membrane potential) et la fragmentation de l'ADN sont inconnus. Bien que le virus de l'hépatite B ait été signalé comme inducteur dans l'ouverture des spermatozoïdes mPTP (Huang et al., 2013), la présente étude est la première qui a signalé une augmentation du calcium dans le MPT et à analyser ses effets sur la production de DCM, les ROS et la fragmentation de l'ADN chez les gamètes mâles humains.

### 3 Statut de stress oxydatif et fragmentation de l'ADN du sperme chez les hommes fertiles et infertiles

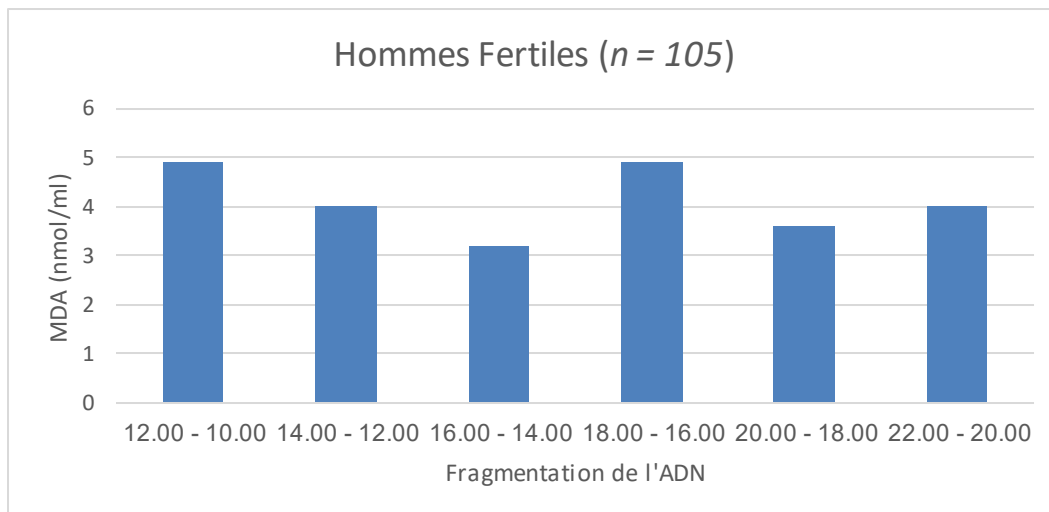


Figure 17 : Corrélations de Spearman entre la fragmentation de l'ADN du sperme chez les hommes fertiles (Dorostghoal et al., 2017).

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

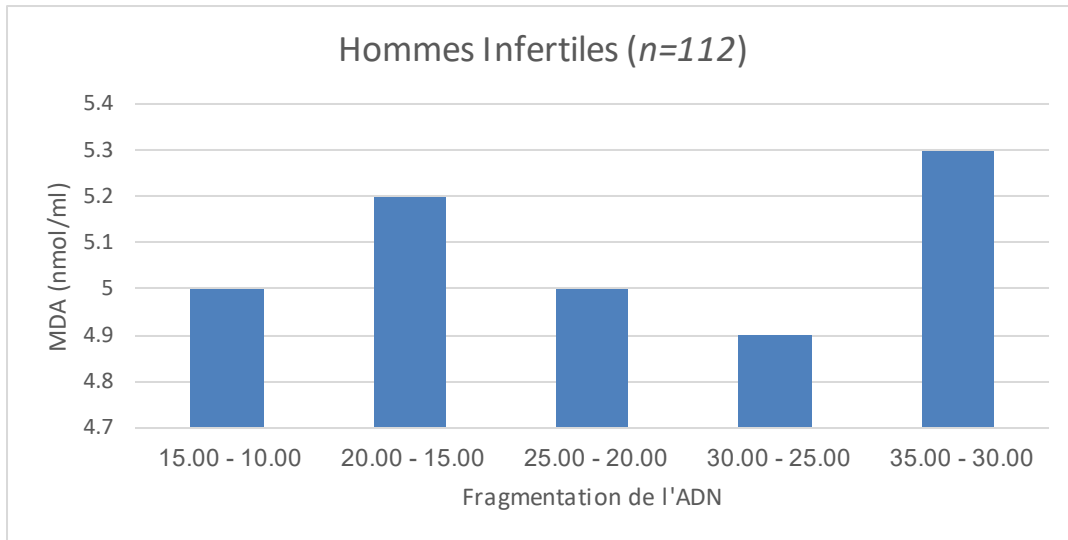


Figure 18 : Corrélations de Spearman entre la fragmentation de l'ADN du sperme chez les hommes infertiles (Dorostghoal et al., 2017).

### ❖ Interprétation :

La corrélation de Spearman entre la fragmentation de l'ADN du sperme, et les niveaux de malondialdéhyde (MDA) dans le plasma séminal chez les hommes fertiles (n = 105) (a-c) et infertiles (n = 112) (d-f).

### ❖ Discussion :

L'étude a également montré que la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est corrélée positivement avec la peroxydation lipidique et négativement avec SOD (Superoxydes dismutase) et GPx (Glutathion peroxydase) taux dans le plasma séminal. Dans de nombreuses études, des fragments d'ADN supérieurs ont été démontrées chez les hommes avec des ROS élevés et un faible taux d'antioxydants capacité dans le plasma séminal (Aktan et al., 2013) ; (Khosravi et al., 2014) ; (Shamsi et al., 2009), qui indiquent clairement l'association entre dommages à l'ADN des spermatozoïdes.

Il a été révélé qu'il y a des niveaux significativement plus élevés de spermatozoïdes avec de l'ADN fragmenté chez les hommes infertiles que chez les témoins fertiles. Le nouveau marqueur de la qualité du sperme qui est impliqué dans la mauvaise fonction des spermatozoïdes et l'hypofertilité (Agarwal et al., 2003) et les taux de conception naturelle plus faibles est la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (Evenson & Wixon, 2008).

Taux plus élevés de perte de grossesse après les traitements de FIV et de FIV-ICSI (Zini & Libman, 2006) ; (Zini & Sigman, 2009) et la morbidité des descendants (Aitken et al., 2009). (Sergerie et al., 2005), et Zhang et al. (2010) ont montré que les dommages à l'ADN des spermatozoïdes étaient significativement plus élevés chez les patients infertiles que chez les hommes fertiles.

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

(Hossen et al., 2015) ont rapporté que les mâles stériles avaient des niveaux significativement plus élevés de plasma séminal 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) comme biomarqueur des dommages à l'ADN que les mâles fertiles. Les mâles oligozoospermiques, asthénozoospermiques et tératozoospermiques ont montré une augmentation significative du nombre de spermatozoïdes avec de l'ADN fragmenté par rapport aux témoins (Khosravi et al., 2014) ; (Shamsi et al., 2009).

De plus, des niveaux significativement plus élevés de fragmentation de l'ADN ont été trouvés dans le sperme de patients atteints d'asthénozoospermie par rapport aux hommes ayant une motilité normale des spermatozoïdes (Benchaib et al., 2003).

Les hommes avec des spermatozoïdes normaux présentent des niveaux de fragmentation de l'ADN inférieurs à ceux des hommes avec des spermatozoïdes anormaux (Evgeni et al., 2015)

### **4 Analyse de la fragmentation de l'ADN, de la translocation membranaire plasmique de la phosphatidylsérine et du stress oxydatif chez les spermatozoïdes humains**

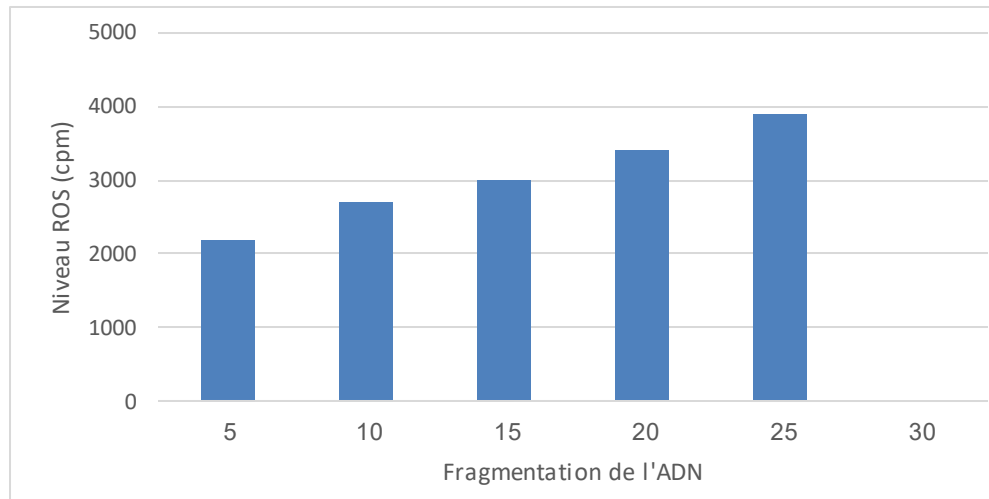


Figure 19 : Coefficient de corrélation de Pearson entre le pourcentage de fragmentation de l'ADN (Barroso et al., 2000).

#### **❖ Interprétation :**

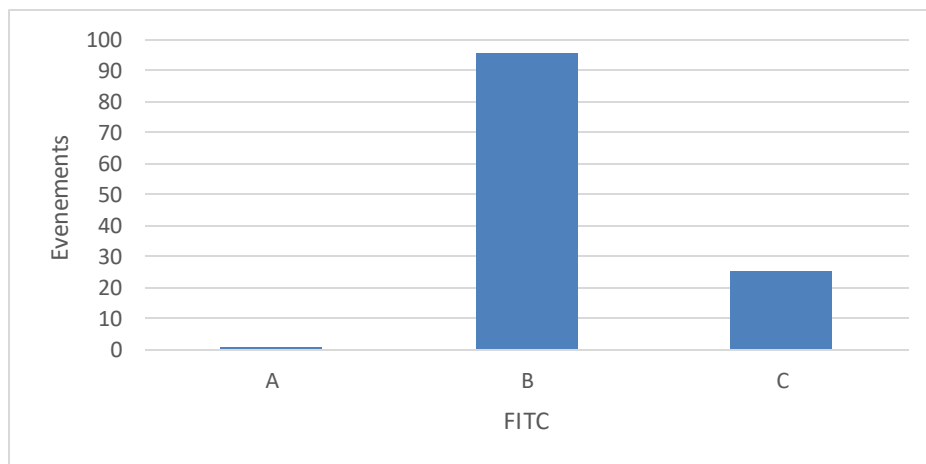
Coefficient de corrélation de Pearson entre le % de fragmentation de l'ADN (évalué par le marquage d'UDP (2'-Deoxyuridine-5'-triphosphate) à l'extrémité de l'encoche médié par la désoxynucléotidyl transférase ADN-terminale) et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (niveau  $\Delta$ , c.p.m.) ( $r$  0,43,  $P = 0,02$ ).

❖ **Discussion :**

Les résultats obtenus avec la méthode TUNEL ont montré de faibles niveaux de dommages à l'ADN (moyenne 1%) dans les fractions de sperme purifiées avec une motilité plus élevée (considérées comme des cellules fonctionnellement compétentes). Ce nombre se situait dans les fractions à faible motilité (moyenne de 11 %) connues pour contenir des spermatozoïdes défectueux. Le test TUNEL détecte les cassures de brins d'ADN.

La terminal désoxynucléotidyl transférase est capable de marquer les extrémités émoussées des cassures d'ADN double brin indépendamment d'une matrice. La méthode TUNEL est considérée comme plus sensible et plus spécifique pour la détection de l'apoptose que la traduction in situ (qui utilise l'ADN polymérase et dépend de la matrice), mais les deux tests peuvent être combinés lorsqu'on essaie de différencier l'apoptose de la nécrose (Gold et al. 1994). Cependant, une comparaison favorable de ces techniques lors de l'examen de spermatozoïdes humains a été rapportée (Manicardi et al., 1998). Néanmoins, même la détection d'ADN fragmenté (test TUNEL) peut ne pas permettre de distinguer l'apoptose, la nécrose et la mort cellulaire autolytique (Grasl Kraupp et al., 1995) ; (Charriaut-Marlangue et Ben-Ari, 1995). Des études ultrastructurales peuvent être nécessaires pour établir définitivement un diagnostic spécifique d'apoptose (Baccetti et al., 1996).

**5 Intérêt de l'étude de l'oxydation de l'ADN des spermatozoïdes par marquage de la 8-oxo-guanine en cyrtométrie en flux chez l'homme infertile**



**Figure 20 : Profils du marquage de la 8-oxo-guanine obtenus par cyrtométrie en flux chez les deux populations témoins et patient (Chakroun et al., 2008).**



## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

### ❖ **Interprétation :**

Profils du marquage de la 8-oxo-guanine obtenus par cyrtométrie en flux chez les deux témoins et chez un patient :

- A : profil du témoin négatif ayant un sperme normal et un taux de spermatozoïde à ADN oxydé < 1% ;
- B : profil du témoin positif (exposition in vitro à l'H2O2) avec un taux de spermatozoïdes à ADN endommagé > 95% ;
- C : profil d'un patient infertile avec un taux d'ADN endommagé = 25%.

### ❖ **Discussion :**

Cette étude a montré une relation entre les leucocytes du sperme et les dommages oxydatifs de l'ADN spermatique, malgré le petit nombre d'échantillons de sperme d'hommes infertiles. Ces résultats reflètent l'effet direct des produits ROS par les leucocytes sur la structure de l'ADN des spermatozoïdes et, probablement, sur leur fertilité. Ils confirment les résultats de l'étude publiée par (Moskovtsev et al., 2007) et Celles de (Erenpreiss et al., 2002).

## **6 Leucospermie, stress oxydatif et fertilité masculine : certitudes et hypothèses**

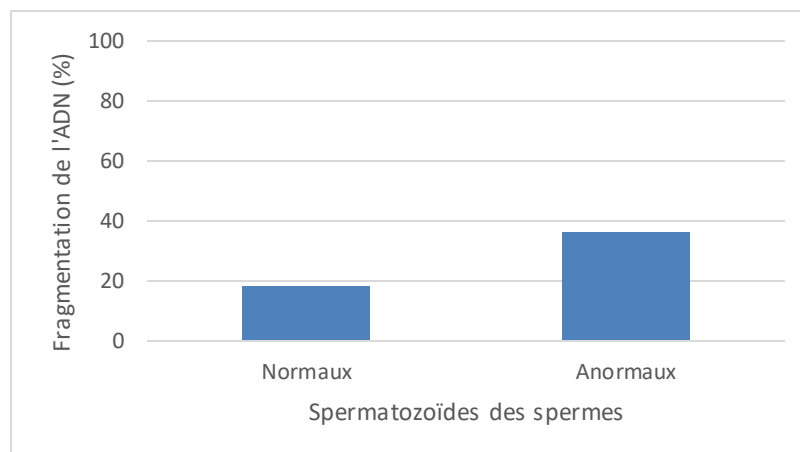


Figure 21 : La fragmentation de l'ADN dans spermatozoïdes normaux et anormaux (Lemkecher et al., 2005).

### ❖ **Interprétation :**

La fragmentation de l'ADN a été étudiée dans un échantillon de 187 spermatozoïdes par coloration à l'orange d'acridine. Une fragmentation a été observée dans 18 % des spermatozoïdes normaux et 36 % des spermatozoïdes anormaux.

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

### ❖ Discussion :

La leucospermie n'affecte pas la fragmentation des spermatozoïdes normaux, elle aggrave significativement celle des spermatozoïdes OAT (Oligoasthenoatozoospermia) de 50%. De même, une corrélation a été montrée entre les dommages à l'ADN et la concentration de leucocytes dans les spermatozoïdes.

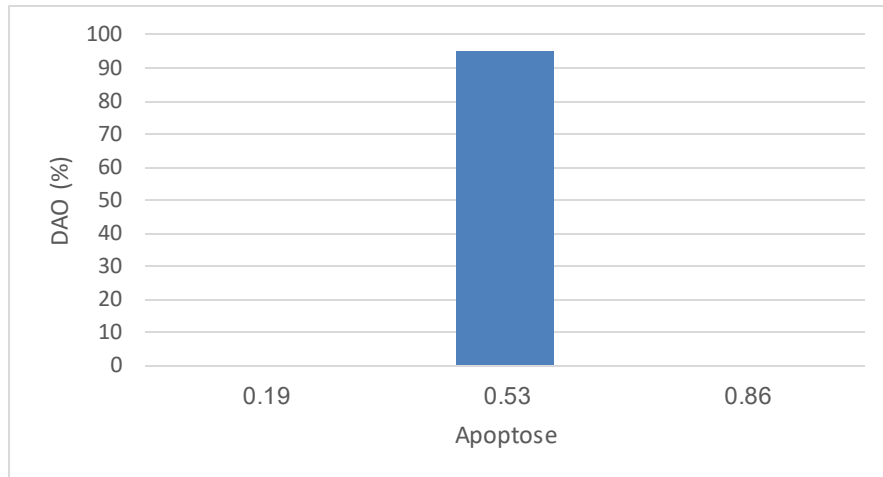


Figure 22 : Étude sur la corrélation de l'apoptose à la production de ROS chez les patients infertiles.

### ❖ Interprétation :

Dans une étude portant sur 31 patients infertiles et 19 donneurs, le groupe (Agarwal, 2008) a étudié l'apoptose avec le test d'annexine V, la dégradation de l'ADN avec le marquage à l'acridine orange et la production de ROS avec la chimiluminescence. Ils ont montré que l'apoptose était significativement corrélée à la production de ROS chez les patients infertiles ( $r = 0,53$  ; 95 % IC [0,19–0,86]) et que les altérations à l'ADN sont principalement associées au stress oxydatif et de manière insignifiante à l'apoptose elle-même.

### ❖ Discussion :

Cette étude a été confirmée par deux études, dont l'une était associée à une augmentation des modifications des spermatozoïdes liées aux ROS et une augmentation du cytochrome c et de la caspase-9 et 3 analysées par Western blot (Lemkecher et al., 2005).

## 7 Dommages à l'ADN des spermatozoïdes induits par le stress oxydatif

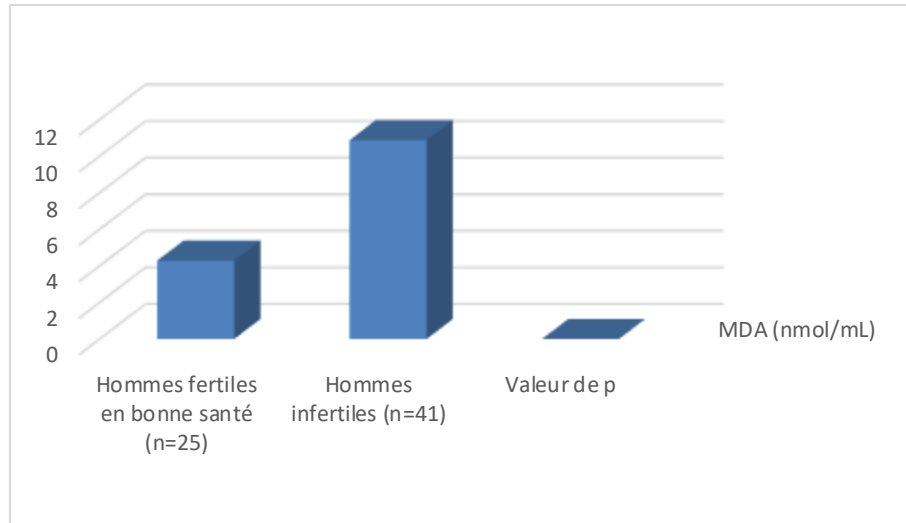


Figure 23 : Différents niveaux de MDA dans le plasma de sperme (Hosen et al., 2015).

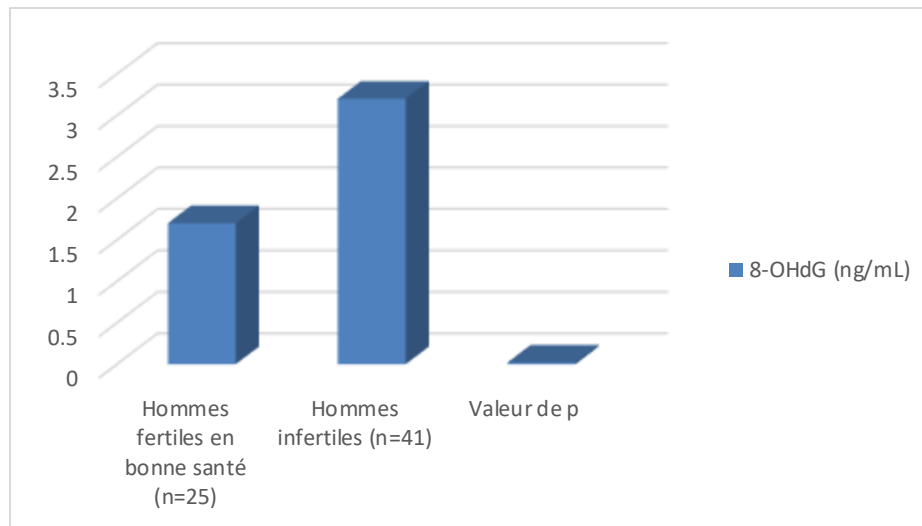


Figure 24 : Différents niveaux de 8-OHdG dans le plasma de sperme (Hosen et al., 2015).

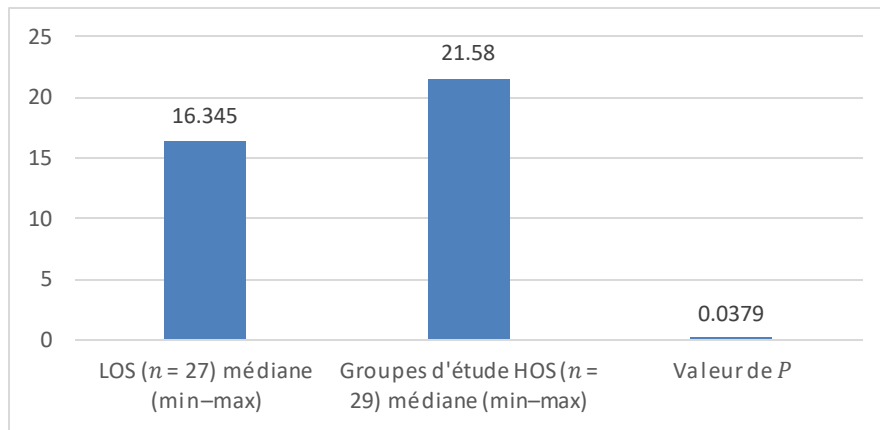
### ❖ Interprétation :

Le test des échantillons indépendants a été utilisé pour déterminer si les résultats étaient significatifs.  $P < 0,05$  était considéré comme significatif. Les données ont été présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type pour le MDA. (Les niveaux évalués concernent les spermatozoïdes chez les hommes fertiles et infertiles).

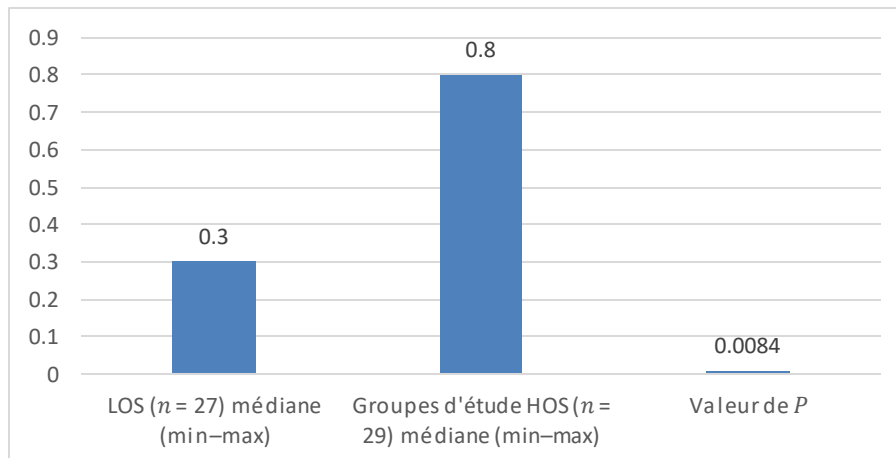
❖ **Discussion :**

Une production excessive de ROS peut entraîner des ruptures de brins d'ADN, une réticulation de l'ADN et des réarrangements chromosomiques. Les dommages à l'ADN des spermatozoïdes sont étroitement associés à l'infertilité masculine et le 8-OHdG (8-Hydroxyguanosine) est un marqueur sensible des dommages oxydatifs à l'ADN. Certains chercheurs ont signalé des niveaux plus élevés de dommages à l'ADN chez les sujets infertiles que chez les hommes fertiles en bonne santé. Tandis que (Aksoy et al., 2000), des niveaux plus élevés de 8-OHdG ont été montrés dans le sperme d'éjaculat d'hommes infertiles.

**8 Stress oxydatif de l'éjaculat est lié à la fragmentation de l'ADN du sperme et aux cellules rondes**



**Figure 25 : Statistiques récapitulatives de la concentration de DFI (Iommiello et al., 2015).**



**Figure 26 : Statistiques récapitulatives de la concentration de cellules rondes liées au niveau d'OS (Iommiello et al., 2015).**

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

### ❖ **Interprétation :**

Statistiques récapitulatives de la concentration de DFI (Indice de fragmentation d'ADN) et de cellules rondes liées au niveau d'OS (Oxidative stress). Les données sont exprimées sous forme de médianes (intervalle interquartile). Le test de somme des rangs de Wilcoxon (**Mann-Whitney**) à deux échantillons a été utilisé pour l'analyse statistique. Les valeurs *P* représentent une comparaison statistique entre la médiane du groupe LOS (Low Oxidative stress) et HOS (High Oxidative stress)

### ❖ **Discussion :**

Une médiane DFI de 16,345 % (4,99–45,07). L'analyse de régression linéaire montre une relation statistiquement significative entre le DFI et le niveau de OS avec une valeur de coefficient de corrélation de 3,76 (IC à 95 % : 0,52 ; 6,99).

En évaluant la concentration de cellules rondes dans les échantillons de sperme, nous avons observé des niveaux élevés d'OS en présence d'une concentration élevée de ce type de cellules suggérant une forte corrélation entre la concentration de cellules rondes  $> 1,5 \times 10^6$  /mL dans le sperme et des niveaux élevés d'OS ( $P = 0,0084$ ) ; cela confirme que les ROS dans l'éjaculat humain proviennent principalement des leucocytes. La concentration médiane de cellules rondes dans le groupe de sperme HOS est de  $0,8 \times 10^6$  /mL (0,1–3,3) contre  $0,3 \times 10^6$  /mL (0,1–2,5) dans le groupe LOS.

OS a été identifié comme l'une des principales causes de l'infertilité masculine en provoquant un dysfonctionnement des spermatozoïdes. L'OS est un état lié à l'augmentation des dommages cellulaires déclenchés par l'oxygène et les radicaux libres dérivés de l'oxygène connus sous le nom de ROS (**Agarwal et al., 2014**).

## 9 Dommages à l'ADN des spermatozoïdes induits par la codéine sont principalement dus au stress oxydatif plutôt qu'à l'apoptose

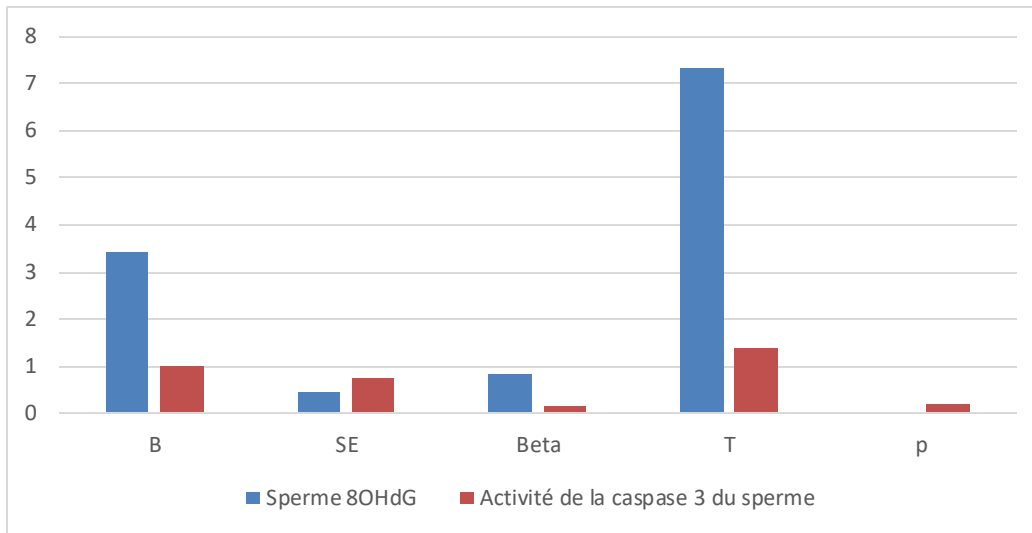


Figure 27 : Une analyse de régression multivariée entre les dommages oxydatifs de l'ADN et l'apoptose (Ajayi et al., 2020).

### ❖ Interprétation :

Une analyse de régression multivariée a été utilisée pour évaluer l'association entre les dommages oxydatifs de l'ADN et l'apoptose, ainsi que la fragmentation de l'ADN du sperme.

- B : coefficient de régression non standardisé ;
- SE : erreur standard pour le coefficient de régression non standardisé ;
- Beta ( $\beta$ ) : coefficient de régression standardisé ;
- T : statistique du test t ;
- P : valeur de probabilité.

### ❖ Discussion :

Une forte corrélation négative a été observée entre la qualité du sperme et les dommages oxydatifs des spermatozoïdes et l'apoptose médiée par la caspase 3. Cette corrélation suggère que la mauvaise qualité du sperme et l'augmentation de la fragmentation de l'ADN du sperme après l'administration de codéine sont dues à des dommages oxydatifs et à l'apoptose.

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

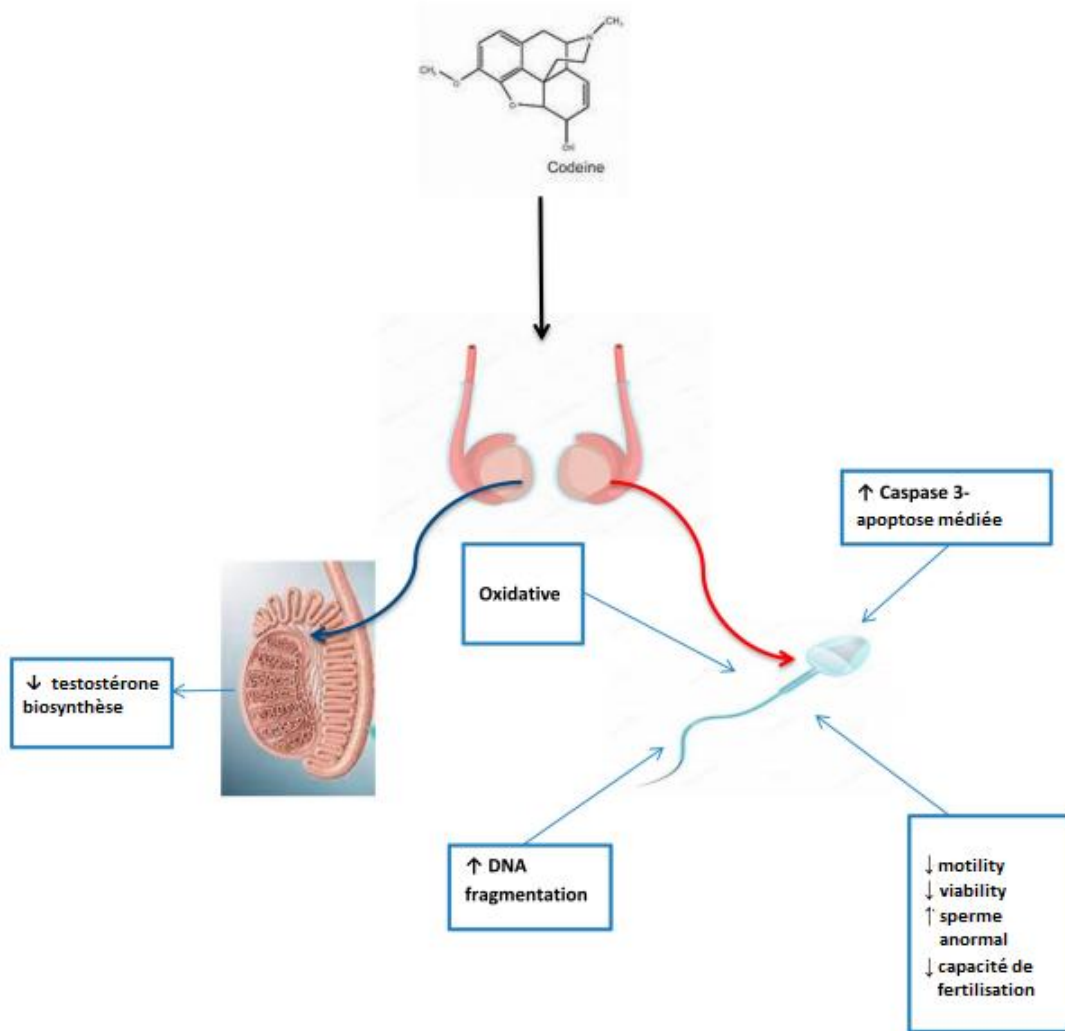
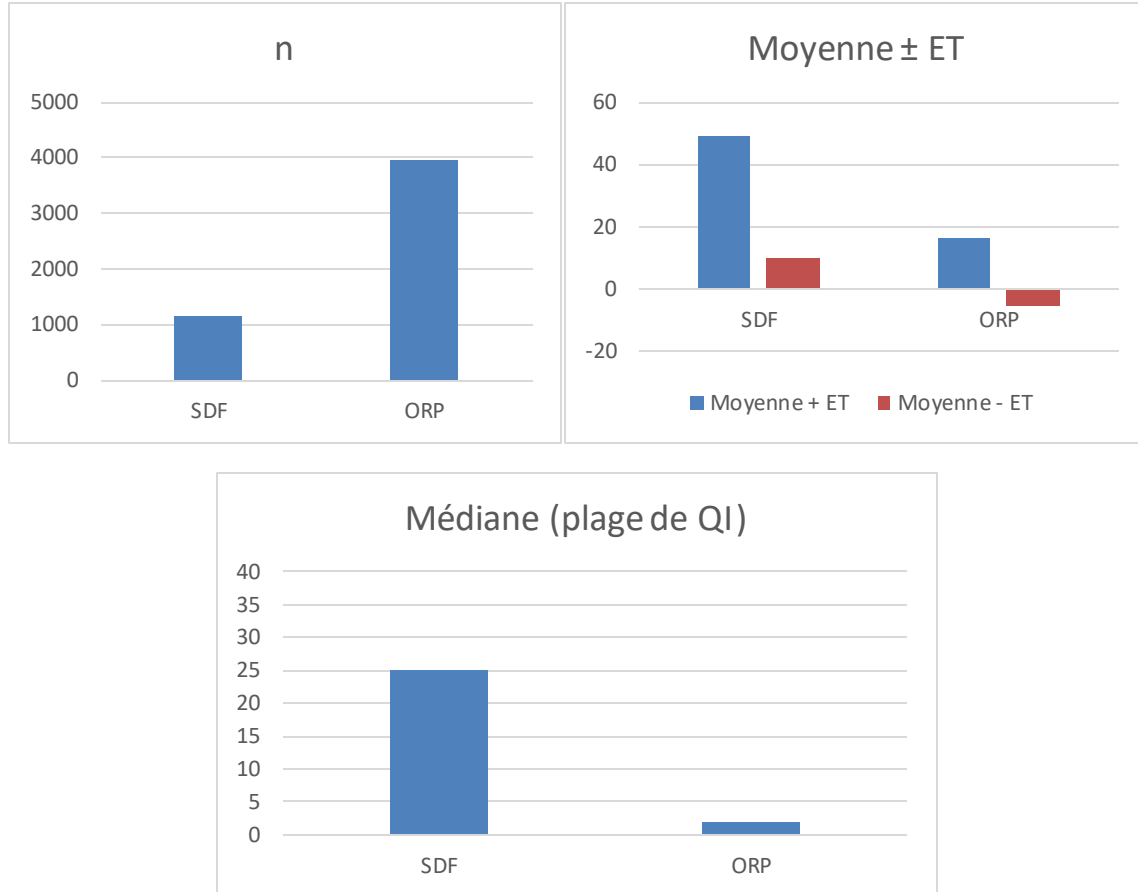


Figure 28 : Mécanisme proposé de l'effet de la codéine sur les spermatozoïdes (Ajay et al., 2020).

## **10 Valeur prédictive du test de stress oxydatif du sperme pour la fragmentation de l'ADN du sperme évaluée par le test de dispersion de la chromatine du sperme**



**Figure 29 : Les niveaux de fragmentation de l'ADN du sperme (SDF) et du potentiel d'oxydo-réduction (ORP) dans les cohortes (Elbardisi et al., 2020).**

### **❖ Interprétation :**

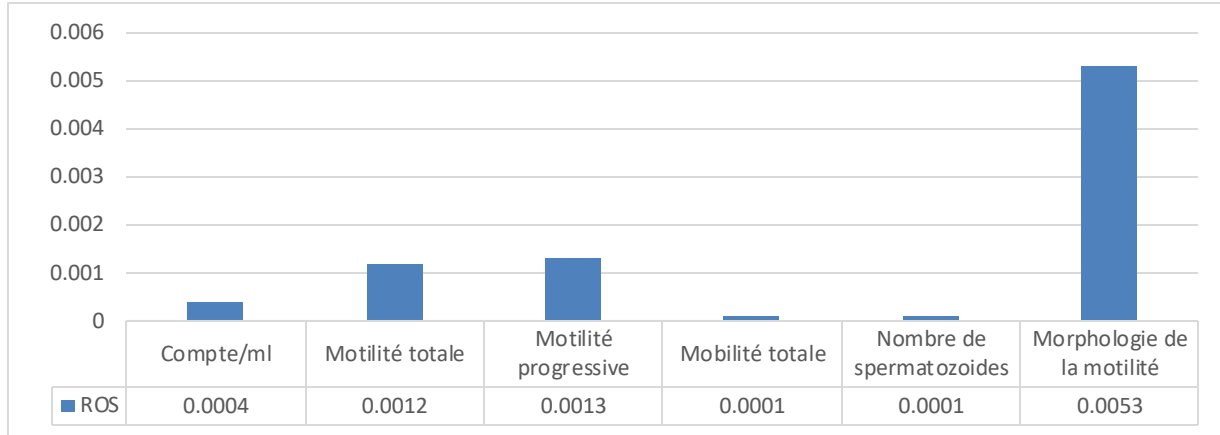
Les niveaux de fragmentation de l'ADN du sperme (SDF) et du potentiel d'oxydo-réduction (ORP) dans les cohortes. Les données sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SD et de valeurs médianes (intervalle interquartile).

### **❖ Discussion :**

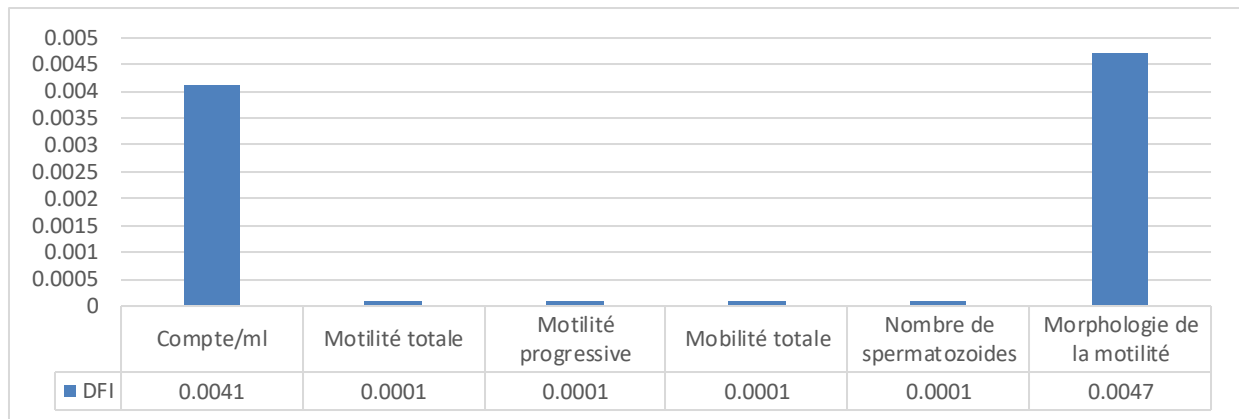
Étant donné que le stress oxydatif a un impact sévère sur l'intégrité de l'ADN du sperme, des recherches ont été menées sur l'utilisation de l'ORP comme prédicteur du SDF. Cette étude rapporte que bien que les niveaux d'ORP soient significativement corrélés avec un SDF élevé, l'ORP ne peut prédire un SDF anormal qu'à une puissance relativement faible.



## 11 Une comparaison entre deux tests pour mesurer le stress oxydatif séminal et leur relation avec la fragmentation de l'ADN du sperme et les paramètres du sperme



**Figure 30 : Corrélation entre le stress oxydatif, l'intégrité génétique du sperme et les paramètres du sperme for ROS (Homa et al., 2019).**



**Figure 31 : Corrélation entre le stress oxydatif, l'intégrité génétique du sperme et les paramètres du sperme for DFI (Homa et al., 2019).**

### ❖ **Interprétation :**

Le stress oxydatif se manifeste par une mauvaise qualité des semences. En utilisant deux méthodes différentes de mesure de la OS, les résultats ont montré une relation négative significative entre la OS et la motilité totale, la motilité progressive, le nombre total de spermatozoïdes mobiles, la vitalité et la morphologie, ce qui suggère que la mesure de la SORP peut être un marqueur plus sensible du stress oxydatif que ROS. Une corrélation négative plus forte et hautement significative a été observée entre le DFI et les paramètres du sperme.

❖ **Discussion :**

Bien que les niveaux d'HDS (High DNA satiability) ne soient pas corrélés à la vitalité, ils sont corrélés négativement avec tous les autres paramètres du sperme. La corrélation entre HDS et morphologie était la plus forte et très significative ( $R^2 = -0,48848$ ,  $p = 0 < 0,0001$ ). Il y avait également une corrélation négative très significative entre l'ORP et la morphologie ( $R^2 = -0,22642$ ,  $p = <0,0001$ ), même si la corrélation n'était pas aussi forte qu'entre l'HDS et la morphologie. Les leucocytes polymorpho nucléaires sont connus pour produire des niveaux élevés de ROS, mais la présence de PMN dans le sperme n'était pas corrélée avec les marqueurs classiques des dommages oxydatifs des spermatozoïdes, y compris la motilité, la motilité et les dommages au sperme.

## 12 Relation entre la fragmentation de l'ADN du sperme, les radicaux libres et la capacité antioxydante avec la perte de grossesse répétée idiopathique

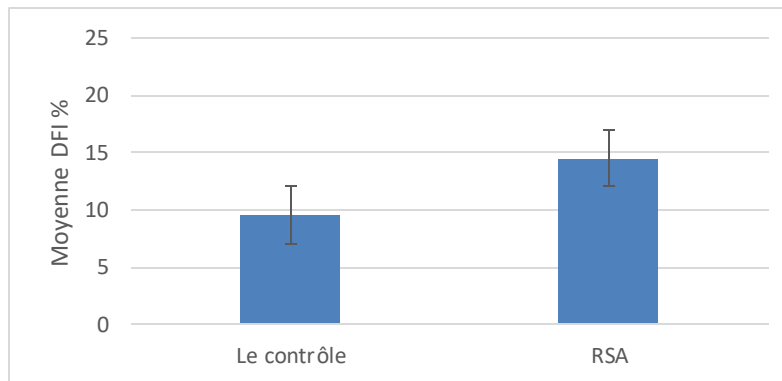


Figure 32 : La moyenne  $\pm$  SD de la fragmentation de l'ADN du sperme mesurée par TUNEL chez les patients RSA et les hommes fertiles comme groupe témoin (Kamkar et al., 2018).

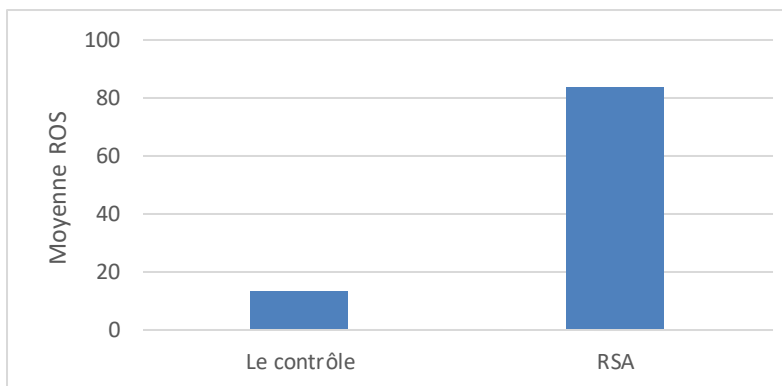


Figure 33 : Moyenne  $\pm$  SD des radicaux libres avec luminescence chez les patients RSA et les hommes fertiles comme groupe témoin (Kamkar et al., 2018).

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

### ❖ **Interprétation :**

Dans la présente étude, une différence significative a été observée entre les spermatozoïdes présentant des dommages à l'ADN mesurés avec SCSA dans le groupe expérimental par rapport au groupe témoin. Il y avait une augmentation significative du pourcentage de fragmentation de l'ADN chez les mâles RPL par rapport aux témoins fertiles.

(**Coughlan et al., 2015**) n'ont trouvé aucune différence significative entre la RPL et la fragmentation de l'ADN chez les mâles RPL et les témoins fertiles en utilisant les méthodes TUNEL et SCD. Les résultats pourraient être dus à la petite population témoin (N = 7) puisque les paramètres du sperme n'ont pas montré de différence significative entre les groupes étudiés. De même, (**Bellver et al., 2010**) qui ont mesuré l'indice de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes par SCD, est arrivé aux mêmes résultats que cette dernière étude.

Cependant, (**Khadem et al., 2014**) utilisant également la méthode SCD, a rapporté qu'il y avait une corrélation négative entre le nombre de spermatozoïdes en mouvement progressif et le SDF, démontrant des niveaux significativement plus élevés de SDF dans le groupe RPL par rapport au groupe témoin.

Notamment, (**Robinson et al., 2012**) a utilisé le test des comètes pour mesurer le DFI du sperme avec des résultats similaires aux nôtres, montrant une pertinence significative. De plus, (**Halim et al., 2016**) a montré des résultats comparables en utilisant le kit Halosperm.

### 13 Microdélétions du chromosome Y, fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et stress oxydatif des spermatozoïdes comme causes d'avortement spontané récurrent d'étiologie inconnue

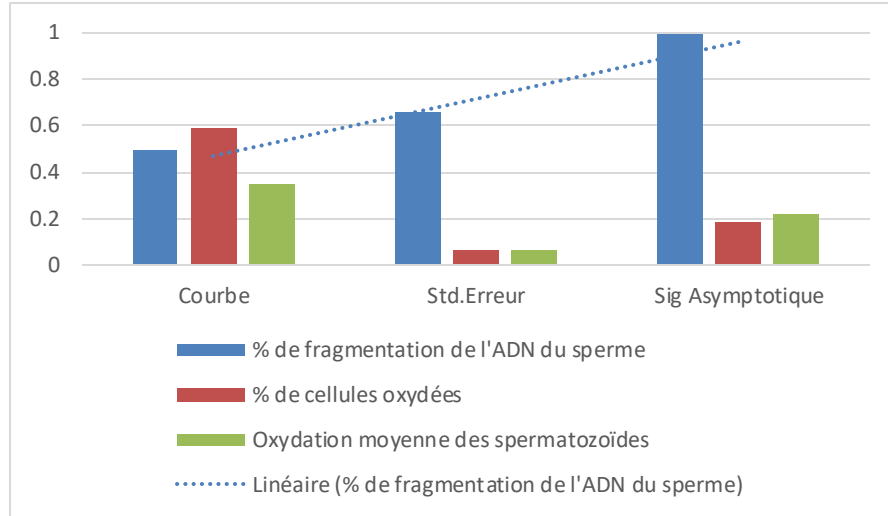


Figure 34 : Analyse de la courbe ROC de la valeur prédictive de la fragmentation et de l'oxydation de l'ADN du sperme pour prévoir le RSA en tenant compte des hommes avec des paramètres de sperme normaux (Bellver et al., 2010).

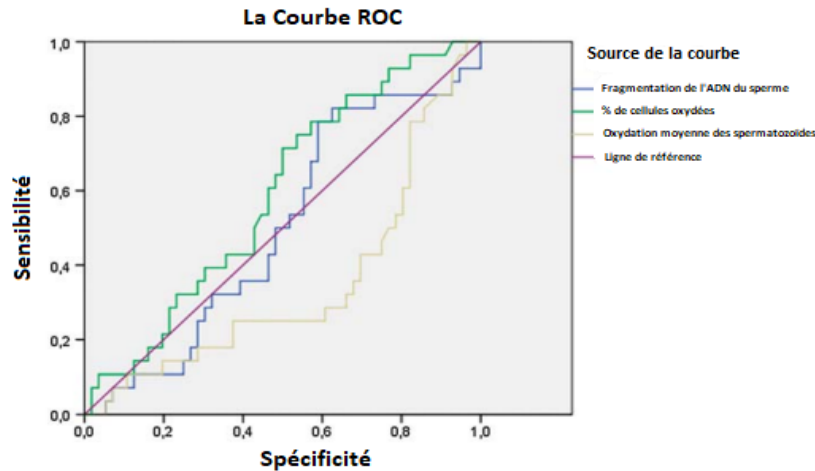


Figure 35 : analyse de la courbe ROC de la valeur prédictive de la fragmentation et de l'oxydation de l'ADN du sperme pour prévoir le RSA (Bellver et al., 2010).

#### ❖ Interprétation :

Des niveaux similaires d'oxydation de l'ADN ont été trouvés en termes de pourcentage de cellules avec de l'ADN oxydé et de l'intensité moyenne de l'oxydation. Seul le pourcentage de cellules oxydatives a montré une légère capacité à prédire adéquatement l'apparition du RSA,

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

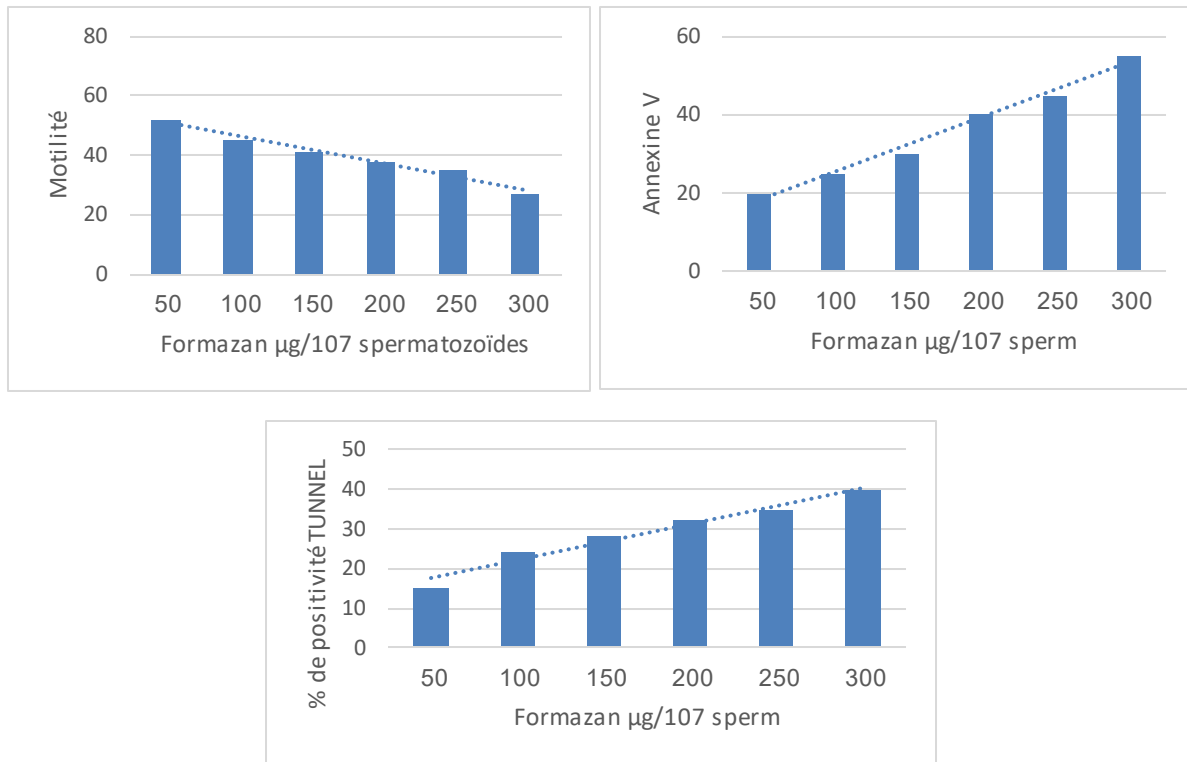
bien que cette capacité prédictive ne semble pas suffisante pour une mise en œuvre comme outil de diagnostic (l'aire optimale sous la courbe devrait être de 0,8).

### ❖ **Discussion :**

Les résultats étaient des échantillons de sperme normaux ou légèrement endommagés du groupe RSA et une fragmentation de l'ADN significativement plus élevée dans le même groupe que les témoins provenant de donneurs fertiles. Cependant, lorsque nous avons évalué la valeur prédictive clinique de ce résultat à l'aide de la courbe ROC, il n'est pas apparu en raison de valeurs qui se chevauchent entre les deux groupes d'hommes. Les résultats sont les mêmes lorsque l'on considère les hommes oligozopémiques dans la courbe ROC et l'analyse de l'exhaustivité de l'ADN du sperme comme outil prédictif, malgré l'apparition d'une fragmentation accrue de l'ADN dans le sperme des hommes avec un inexplicé. La valeur clinique d'est négligeable. De même, un rôle causal de la fragmentation de l'ADN dans RSA (Recurrent spontaneous abortion) ne peut être démontré.

La fragmentation de l'ADN était significativement plus élevée dans le groupe RSA que chez les donneurs de fertilité connus et la population générale des hommes. Par conséquent, il s'agit de la première étude à évaluer le stress oxydatif des spermatozoïdes associé au RSA idiopathique.

## **14 Développement du test NBT comme marqueur du stress oxydatif du sperme**



**Figure 36 : Analyse de régression linéaire illustrant la relation entre la production de ROS, la motilité des spermatozoïdes, apoptose précoce (coloration à l'annexine V) et la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (dosage TUNEL) (Tunc et al., 2010).**

### **❖ Interprétation :**

Analyse de régression linéaire illustrant la relation entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (lg Formazan /107 spermatozoïdes) et la motilité des spermatozoïdes (A), l'apoptose précoce (coloration à l'annexine V) (B) et la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (dosage TUNEL) (C) entre les groupes fertiles et infertiles réunis. Les corrélations de régression de Spearman et les valeurs de p ont été enregistrées pour chaque observation.

### **❖ Discussion :**

À notre connaissance, cette étude est la première à établir un lien entre la production d'espèces réactives de l'oxygène à l'aide du test NBT (Nitro blue tetrazolium) et des marqueurs de la qualité du sperme tels que la fragmentation et la motilité de l'ADN du sperme. La production de Formazan était significativement corrélée à une diminution de la motilité des spermatozoïdes. Ce résultat est cohérent avec des études antérieures montrant que la production de ROS du sperme quantifiée par des techniques de chimioluminescence est

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

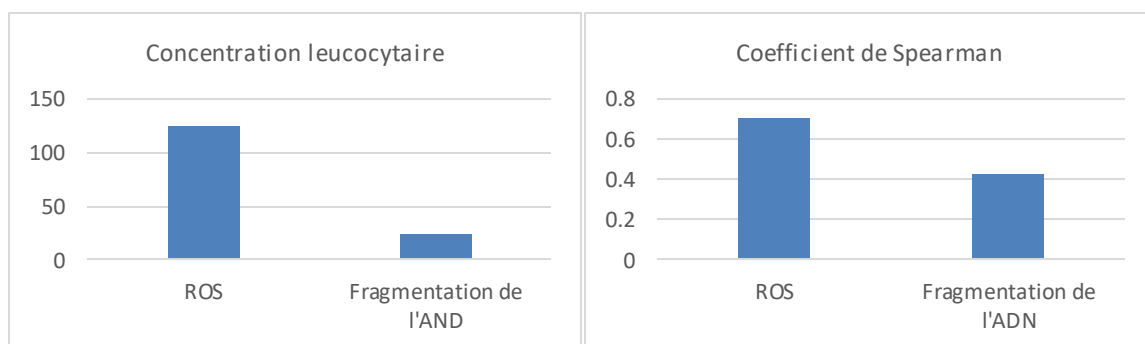
corrélée négativement avec la motilité des spermatozoïdes (Aitken, 1989) ; (Whittington & Ford, 1998). Il est possible qu'une production accrue de ROS altère la motilité des spermatozoïdes par deux mécanismes différents : Premièrement, les ROS stimulent l'oxydation membranaire des spermatozoïdes, réduisant leur flexibilité et la motilité de leur queue. Les membranes des spermatozoïdes sont vulnérables à ce type de dommages car elles contiennent beaucoup d'acides gras insaturés. Deuxièmement, il faut une nouvelle approche pour résoudre ce problème.

Il y a eu une corrélation positive significative entre la production de Formazan et l'augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, ce qui correspond à la capacité bien établie des ROS à endommager l'ADN des spermatozoïdes. Les radicaux libres peuvent induire la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes par deux mécanismes. Premièrement, les ROS peuvent attaquer directement les bases puriques et pyrimidiques, ainsi que le squelette d'ADN désoxyribose des spermatozoïdes. Deuxièmement, les dommages causés par les radicaux libres déclenchent la fragmentation par endonucléase apoptotique de l'ADN du sperme (Moustafa et al., 2004). Il a été rapporté que les hommes infertiles produisant des niveaux élevés de ROS présentent des niveaux significativement plus élevés d'apoptose précoce des spermatozoïdes (annexine V +, PI-) par rapport aux hommes infertiles avec de faibles niveaux de production de ROS.

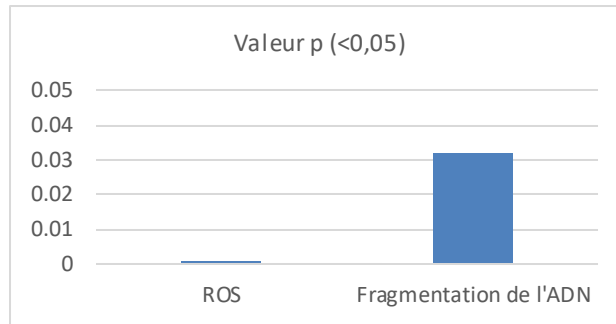
Étant donné que la production de Formazan était fortement corrélée à l'apoptose précoce dans cette étude, il est probable que l'augmentation observée de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes observée sous un stress oxydatif accru soit le résultat net de l'attaque des ROS et du clivage apoptotique de l'ADN par l'endonucléase.

### **15 Implication des leucocytes séminaux, des espèces réactives de l'oxygène et du potentiel de la membrane mitochondriale des spermatozoïdes dans les dommages à l'ADN des spermatozoïdes humains**

(Lobascio et al., 2015)



## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes



**Figure 37 : Analyses de corrélation entre la concentration de leucocytes, la motilité des spermatozoïdes, la concentration, les ROS séminales et le nombre de spermatozoïdes présentant une fragmentation de l'ADN (Lobascio et al., 2015).**

### ❖ **Interprétation :**

La mesure des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produisant des leucocytes dans le sperme a été un élément standard de l'analyse du sperme, mais sa véritable signification reste encore inconnue. Dans cette étude, nous avons corrélé le nombre de leucocytes séminaux à divers paramètres du sperme. Nous avons trouvé une corrélation négative entre le nombre de leucocytes et la concentration de spermatozoïdes ( $r_s = 0,22$  ;  $p = 0,01$ ) et la motilité ( $r_s = 0,20$  ;  $p = 0,02$ ). En revanche, une corrélation positive entre le nombre de leucocytes et les deux ROS séminales ( $r_s = 0,70$ ,  $p < 0,001$  ;  $n = 125$ ) et le nombre de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN ( $r_s = 0,43$ ,  $p = 0,032$  ;  $n = 25$ ) a été trouvé.

Cependant, seule une tendance de corrélation positive entre les ROS et le nombre de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN détectée par TUNEL a été observée. De plus, cette dernière n'était pas corrélée à la perte de potentiel de membrane mitochondriale des spermatozoïdes (10 % vs 35 %,  $r_s = 0,25$ ,  $p = 0,08$  ;  $n = 50$ ).

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que la présence d'un grand nombre de leucocytes dans le sperme affecte négativement les facteurs clés du sperme, tels que la concentration et la motilité des spermatozoïdes, associés aux cas d'infertilité. De plus, ces résultats indiquent que les leucocytes sont la principale source de ROS et la raison de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Cependant, l'absence de corrélation claire entre les ROS et la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, ainsi que les dommages à l'ADN des spermatozoïdes et la perte de MMP, suggère que les ROS produits par les leucocytes ne sont peut-être pas la seule cause des dommages à l'ADN dans les spermatozoïdes et que les voies d'apoptose intrinsèques dépendantes des mitochondries peuvent ne pas affecter de manière significative la fragmentation de l'ADN du sperme.



## 16 Fragmentation et l'oxydation de l'ADN du sperme sont indépendantes du malondialdéhyde

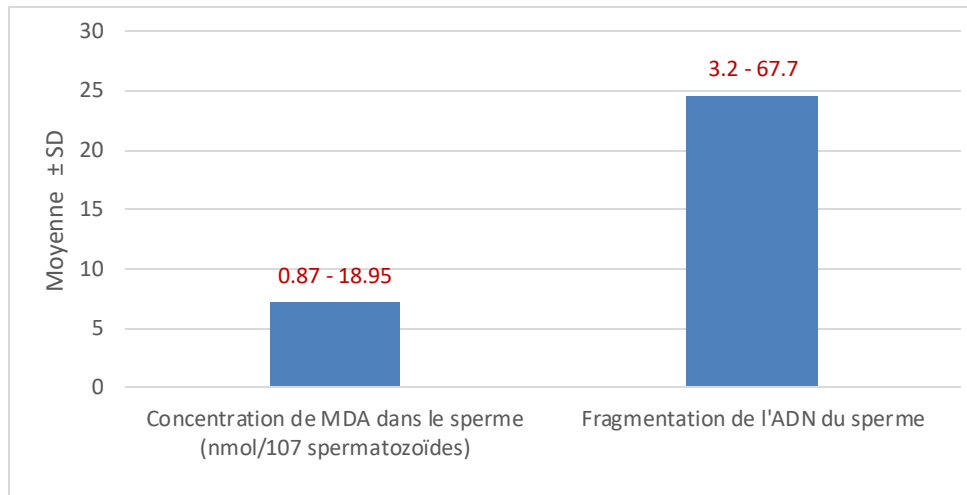


Figure 38 : Statistiques récapitulatives des paramètres du sperme dans la population étudiée (n = 55) (Zribi et al., 2011).

\* Grade du mouvement des spermatozoïdes selon les critères de l'OMS : la plage est en rouge.

### ❖ Discussion :

Nombreuses études se sont concentrées sur la relation entre les dommages à l'ADN du sperme et les paramètres standard du sperme (Lopes et al., 1998), (Sergerie et al., 2005), mais peu ont cherché des indices sur son origine (Santiso et al., 2010), (Aitken et al., 2010). Notre étude était un test TUNEL OxyDNA de cytométrie en flux combiné à un test MDA pour étudier le rôle du stress oxydatif dans la génération de dommages à l'ADN du sperme.

En ce qui concerne la relation entre les dommages à l'ADN du sperme et la qualité du sperme, nous avons constaté que la fragmentation de l'ADN était plus élevée chez les patients atteints d'asthénozoospermie que chez ceux sans asthénozoospermie. La forte prévalence de la fragmentation de l'ADN dans les échantillons de graines dysspermiques par rapport aux échantillons normospermiques a déjà été rapportée (Lopes et al., 1998), (Sergerie et al., 2005), (Mehdi et al., 2009).

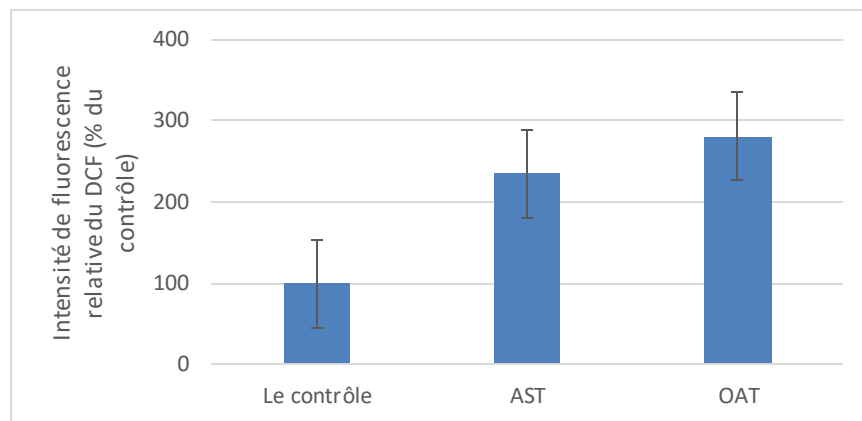
La fragmentation de l'ADN du sperme était également corrélée à certains paramètres du sperme selon d'autres études (Aitken et al., 2010) (Said et al., 2005). Cependant, concernant l'oxydation de l'ADN, nous n'avons trouvé aucune différence significative entre les deux groupes d'étude ; Les taux de 8-oxoguanine étaient corrélés à la concentration de leucocytes et à l'une des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (fracture du cou). Ces résultats sont cohérents avec certains rapports (Nakamura et al., 2002), mais en désaccord avec d'autres (Meseguer et al., 2008), (Shen et al., 2000), (Hwang et al., 2008) ; cette contradiction peut

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

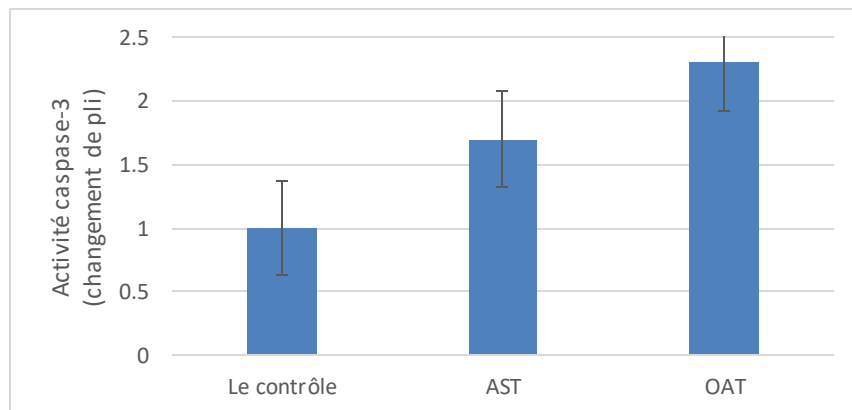
être due à l'utilisation de différentes méthodes qui manquent de standardisation et de validation dans différents groupes de sujets (Sharma et al., 2010).

En plus d'évaluer la fragmentation et l'oxydation de l'ADN du sperme, nous avons également utilisé le dosage du malondialdéhyde (MDA) pour mesurer la peroxydation des lipides dans le sperme.

### **17 Effet du statut redox séminal sur la peroxydation lipidique, l'apoptose et la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes d'hommes saoudiens infertiles**



**Figure 39 : Comparaison des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène séminal (ROS) entre les groupes fertiles normozoospermiques (témoin) et asthénozoospermiques (AST) et oligoasthénotérozoospermies (OAT) (Fatima et al., 2020).**



**Figure 40 : Comparaison de l'activité de la caspase-3 dans les lysats de spermatozoïdes issus des groupes fertiles normozoospermiques (témoins) et asthénozoospermiques (AST) et oligoasthénoteratozoospermies (OAT) (Fatima et al., 2020).**

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

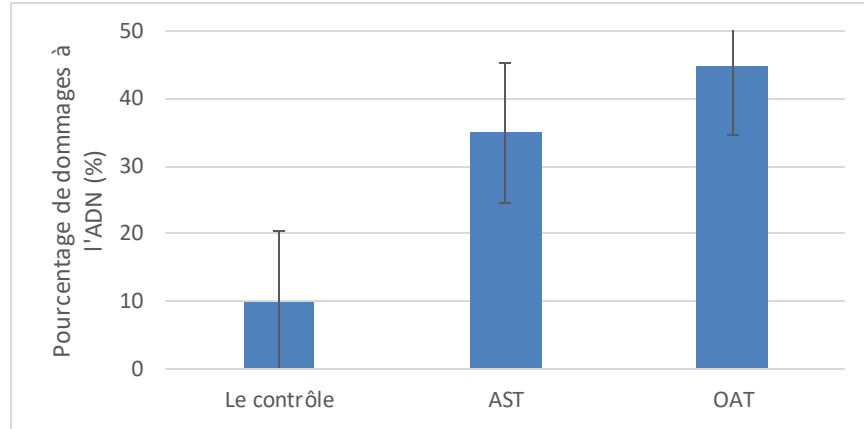


Figure 41 : Fragmentation de l'ADN dans le sperme humain déterminée par le test TUNEL (Fatima et al., 2020).

### ❖ **Interprétation :**

Parmi tous les groupes étudiés, une relation a été trouvée entre le TAS (Total antioxidant status) séminal, le ROS séminal, les marqueurs de stress oxydatif du sperme, la fragmentation de l'ADN et les paramètres conventionnels du sperme. Dans le plasma séminal, les niveaux accrus de ROS étaient corrélés négativement ( $r = -0,51$ ,  $p < 0,001$ ) avec la TAS. Les niveaux de ROS des graines ont montré une forte corrélation positive avec les niveaux de 4-HNE (4-hydroxynonanal) ( $r=0,46$ ,  $p<0,001$ ),  $r=0,53$ ,  $p<0,001$ ) et les niveaux de fragmentation de l'ADN ( $r=0,48$ ,  $p<0,001$ ) (Fatima et al., 2020).

La diminution observée des valeurs séminales de TAS chez les hommes infertiles était inversement associée à une augmentation de l'activité de la caspase-3 ( $r = -0,22$ ,  $p = 0,028$ ), 4HNE ( $r = -0,36$ ,  $p = 0,002$ ) et de la fragmentation de l'ADN ( $r = -0,39$ ,  $p = 0,028$ ).  $<0,001$ ) De plus, les niveaux de ROS des spermatozoïdes ont montré une corrélation négative significativement forte avec la concentration totale de spermatozoïdes ( $r = -0,38$ ,  $p = 0,003$ ). Des corrélations négatives fortes similaires ont été observées parmi les populations étudiées pour la motilité totale des spermatozoïdes ( $r = -0,56$ ,  $p < 0,001$ ) et la morphologie normale des spermatozoïdes ( $r = -0,61$ ,  $p = 0,001$ ).

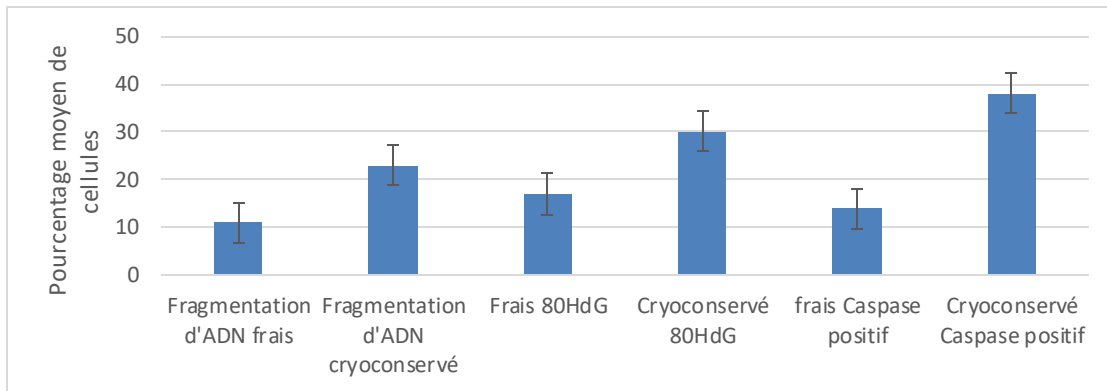
L'augmentation de la fragmentation de l'ADN et de l'activité de la caspase-3 a également montré une forte association négative avec une diminution de la motilité des spermatozoïdes ( $r = -0,58$ ,  $p < 0,001$  ;  $r = -0,51$ ,  $p < 0,001$ , respectivement) et une morphologie normale des spermatozoïdes ( $r = -0,48$ ,  $p < 0,001$  ;  $r = -0,56$ ,  $p < 0,001$ ) pour tous les groupes étudiés. De plus, la diminution de la concentration de spermatozoïdes n'a montré aucune association significative avec la fragmentation de l'ADN et l'activité de la caspase-3.

Nous avons également analysé les corrélations entre les niveaux de 4-HNE et les paramètres du sperme. Une corrélation négative significative a été observée entre les niveaux de 4-HNE, la motilité totale des spermatozoïdes ( $r=-0,62$ ,  $p<0,001$ ) et la morphologie normale

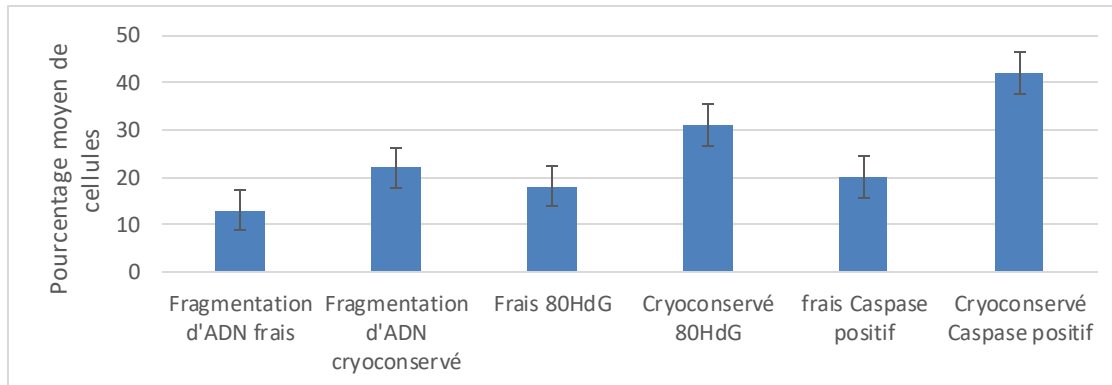
## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

des spermatozoïdes ( $r=-0,53$ ,  $p<0,001$ ). Il y avait une relation inverse entre la concentration de sperme et le niveau de 4-HNE parmi la population étudiée ( $r = -0,37$ ,  $p = 0,004$ ). De plus, les niveaux de 4-HNE dans le sperme étaient positivement associés au pourcentage de dommages à l'ADN ( $r=0,52$ ,  $p<0,001$ ) et à l'activité de la caspase-3 ( $r=0,48$ ,  $p<0,001$ ) (Fatima et al., 2020).

### **18 Dommages à l'ADN du sperme humain induits par la cryoconservation sont principalement médiés par le stress oxydatif plutôt que par l'apoptose**



**Figure 42 : Effet de la cryoconservation sur la fragmentation de l'ADN du sperme, la 8OHdG et l'apoptose (Fraction à haute densité) (Thomson et al., 2009).**



**Figure 43 : Effet de la cryoconservation sur la fragmentation de l'ADN du sperme, la 8OHdG et l'apoptose (Non Fractioné) (Thomson et al., 2009).**

#### **❖ Interprétation :**

La comparaison du pourcentage de fragmentation de l'ADN du sperme, des dommages oxydatifs des bases et de l'activation de la caspase dans les spermatozoïdes avant et après la cryoconservation.

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

- **Relation entre la fragmentation de l'ADN, la 8-Hydroxyguanosine et l'activation de la caspase dans le sperme frais :**

Avant la séparation, une forte corrélation positive a été trouvée entre le pourcentage de fragmentation de l'ADN du sperme et le pourcentage de 8OHdG (8-Hydroxyguanosine). La même corrélation a été trouvée entre ces deux paramètres dans la fraction à haute densité ( $r = 0,568$ ,  $P = 0,01$ ). Une corrélation très positive a également été trouvée entre le pourcentage de fragmentation de l'ADN du sperme et le pourcentage de cellules caspase-positives dans les échantillons séparés ( $r = 0,711$ ,  $P = 0,001$ ). Le pourcentage moyen de fragmentation de l'ADN du sperme et le pourcentage moyen de 8OHdG étaient plus élevés chez les patients dont l'analyse du sperme est anormale (7,4 contre 12,4 %,  $P = 0,01$  et 15,2 contre 25,2 %, respectivement,  $P = 0,001$ ).

- **Effet de la cryoconservation sur la fragmentation de l'ADN du sperme, les cellules 8OHdG et caspase positives :**

La cryoconservation a provoqué une augmentation significative du pourcentage de fragmentation de l'ADN du sperme, du pourcentage de 8OHdG et du pourcentage de cellules caspase-positives (**Figure 39 et 40**). La séparation à l'aide de DGC n'a pas pu réduire ces augmentations par la suite, sans différences significatives entre les paires post-dégel séparées et non séparées.

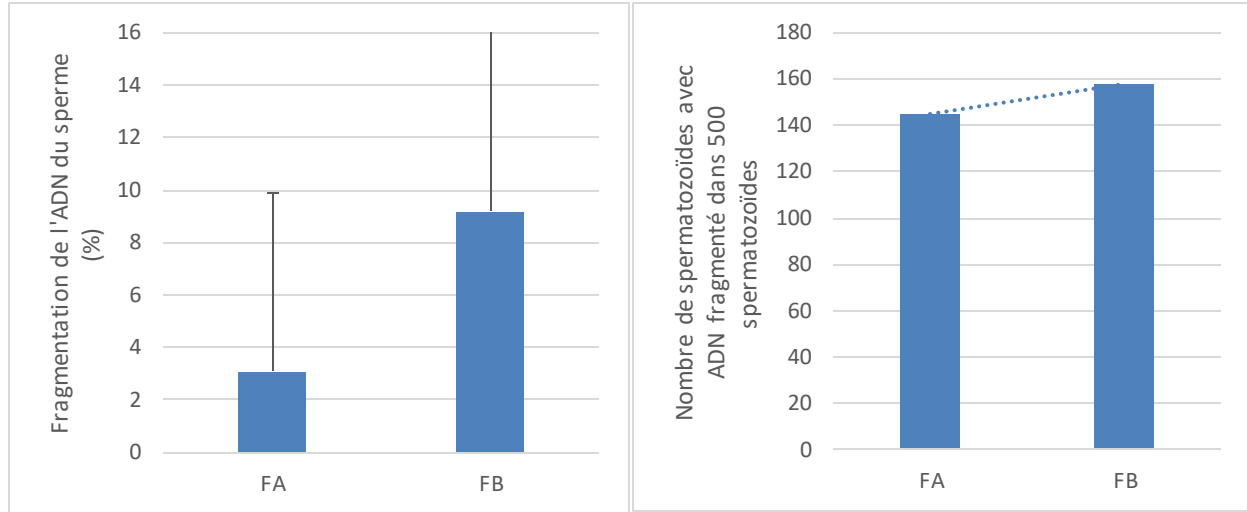
- **Relation entre la fragmentation de l'ADN du sperme, 8OHdG et les cellules positives à la caspase après cryoconservation :**

Le pourcentage de fragmentation de l'ADN du sperme s'est avéré positivement associé au pourcentage de 8OHdG après cryoconservation et séparation à l'aide de DGC. L'association entre ces deux paramètres n'a pas atteint la signification dans les échantillons non divisés ( $r = 0,414$ ,  $P = 0,07$ ).

Le degré d'augmentation du pourcentage de fragmentation de l'ADN du sperme et du pourcentage de 8OHdG était également positivement corrélé dans les échantillons non fractionnés ( $r = 0,486$ ,  $P = 0,05$ ) et fractionnés ( $r = 0,656$ ,  $P = 0,05$ ).

Une corrélation négative a été identifiée entre le pourcentage de cellules positives à la caspase et le pourcentage de fragmentation de l'ADN du sperme dans les échantillons non fractionnés uniquement ( $r = -0,455$ ,  $P = 0,05$ ).

## **19 Utilisation d'ordinateurs portables connectés à Internet via Wi-Fi diminue la motilité des spermatozoïdes humains et augmente la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes**



**Figure 44 : Exposition à un ordinateur portable et fragmentation de l'ADN du sperme humain (Avendano et al., 2012).**

### **❖ Interprétation :**

L'exposition des ordinateurs portables aux radiations a été liée à la fragmentation de l'ADN du sperme humain. Les suspensions de sperme ont été incubées sous un ordinateur portable connecté à Internet par Wi-Fi pendant quatre heures à 25 degrés Celsius. Des échantillons du même type ont été placés hors de portée d'autres ordinateurs ou appareils électroniques, dans une pièce séparée. La fragmentation de l'ADN du sperme a augmenté après 4 h d'exposition à l'ordinateur portable. Dans le groupe test, 8,6 % à 6,6 % des cellules étaient fragmentées, tandis que seulement 3,3 % à 6,0 % dans le groupe témoin présentaient une fragmentation de l'ADN (\*  $P < 0,01$ ). Un graphique des réponses individuelles de fragmentation de l'ADN du sperme à l'exposition à un ordinateur portable a été évalué dans deux aliquotes du même échantillon (500 cellules/aliquote).

### **❖ Discussion :**

Dans une étude in vivo, il a été démontré que l'exposition aiguë aux champs de radiofréquence des téléphones portables module le stress oxydatif des radicaux libres en augmentant la peroxydation lipidique et en diminuant l'activité des antioxydants, la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase, dans les érythrocytes de volontaires humains (Moustafa et al., 2001). De plus, un effet génotoxique sur le sperme épидidymaire a été rapporté lorsque des souris ont été exposées à des radiations pendant 7 jours à raison de 12 heures par jour (Aitken et al., 2005).

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Contrairement aux cellules somatiques, le sperme est une cellule hautement spécialisée avec un acide nucléique condensé (rempli de protamine) et une très petite région viscérale (**Eddy et al., 1994**). Au cours de la spermatogenèse, les spermatozoïdes humains peuvent prendre jusqu'à une semaine pour se déplacer des tubules séminifères dans les testicules à la queue de l'épididyme (**Turner TT**), période au cours de laquelle ils seront fortement exposés à l'exposition RF-EMW (**Aitken et al., 2005**) ; (**De luliss et al., 2009**), en particulier d'une source proche des testicules et de l'épididyme comme un ordinateur portable ou Wi-Fi.

# **CHAPITRE 3**

## **Résultats et Discussion**



### 1 Effet des ROS sur l'ouverture des pores de la membrane mitochondriale interne

#### ❖ Résultats :

Pour évaluer le MPT (Transition de perméabilité mitochondriale), la méthode à la calcéine-AM et au chlorure de cobalt a été utilisée. Lorsque le sperme humain est chargé de calcéine sous forme d'ester d'acétoxyméthyle (AM), la calcéine est piégée dans tous les compartiments sous-cellulaires, y compris les mitochondries.

La diminution du MFI (Intensité de fluorescence moyenne) observée dans le sperme suite à l'ajout de chlorure de cobalt est due à l'extinction de la calcéine (Petronilli et al., 1999) ; (Baines et al., 2005).

La fluorescence de la calcéine restante dans la partie médiane des spermatozoïdes correspond aux mitochondries dont la membrane interne intacte empêche l'entrée du chlorure de cobalt. Puisque l'augmentation du calcium mitochondrial induit l'ouverture des pores mPTP (Pore de transition de perméabilité mitochondriale), nous avons incubé des spermatozoïdes avec de l'ionomycine en présence de calcéine-AM (calcéine acétoxyméthyle) et de chlorure de cobalt (Gautier et al., 2012). La diminution significative de la fluorescence des spermatozoïdes traités à l'ionomycine (un antibiotique produit par la bactérie *Streptomyces conglobatus*) indique une perte d'intégrité de la membrane mitochondriale interne, probablement due à la formation et à l'ouverture des mPTP.

En revanche, les spermatozoïdes incubés dans un milieu sans calcium et analysés après addition de calcéine-AM, de chlorure de cobalt et d'ionomycine n'ont montré aucune diminution de l'intensité de fluorescence. Cela montre que le MPT a été induit par une augmentation du calcium cytosolique et exclut un effet direct de l'ionomycine.

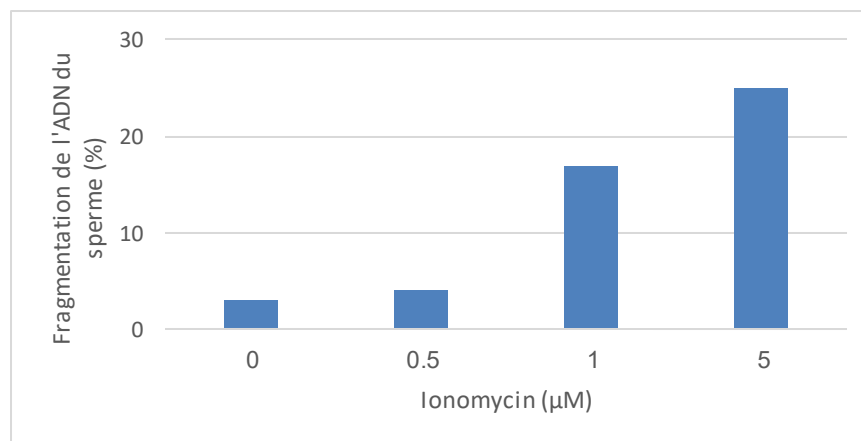


Figure 45 : Les effets de l'ouverture de mPTP sur la fragmentation de l'ADN dans des spermatozoïdes humains.

#### ❖ Discussion :

Dans cette étude (Treulen et al., 2015), il a été constaté que la production de ROS après exposition à l'ionomycine était augmentée. Une explication possible à cela est que le MPT à ouverture mPTP induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale et une inhibition de la chaîne respiratoire par un changement de conformation qui augmente considérablement la production de ROS (Batandier et al., 2004). Lorsque le calcium se lie à une molécule de cardiolipine liée à l'ANT (Transporteur d'adénine nucléotide), le cytochrome c se dissocie de l'intima, ce qui induit une fuite progressive d'électrons de la chaîne respiratoire, inhibant le complexe respiratoire III au niveau de la chaîne respiratoire. Il laisse entendre que ce sera fait. L'ubiquinol cytochrome c oxydoréductase est importante dans la génération de ROS, et à mesure que le niveau de ROS augmente, la fonction de l'enzyme augmente également (Grijalba et al., 1999) ; (Petrosillo et al., 2004) ; (Akopova et al., 2011).

Selon les conditions expérimentales de ces résultats, la production de ROS était un événement précédant la perte de DCm. Cela concorde avec les rapports précédents sur les cellules somatiques où il a été rapporté que l'ouverture de mPTP augmentait la production de ROS (Batandier et al., 2004). Les ROS peuvent alors induire la libération du cytochrome c mitochondrial, ainsi que la co-activation des caspase-9 et 3 (Fulda et al., 1997) ; (Fulda et Debatin 2005). Une fois activée, la caspase 3 exerce son activité catalytique à l'intérieur des mitochondries, entraînant une perturbation de la DCm mitochondriale. Cette interférence avec les complexes de chaînes de transport d'électrons I et II entraîne la mort de la cellule (Ricci et al., 2003), un mécanisme également suggéré pour le sperme humain (Espinoza et al., 2009b).

Le MPT provoque une perturbation du DCm et une augmentation de la production de ROS dans le sperme humain exposé à une surcharge en calcium, nous suggérons que le MPT provoque une altération de la chaîne de transport d'électrons, ce qui entraîne à son tour une dissipation du DCM et pourrait entraîner une augmentation du ROS. La production est soutenue par ce qui a été décrit dans les troubles mitochondriaux associés au dysfonctionnement des composants de la chaîne respiratoire, dans lesquels le DCm et l'activité des voies respiratoires sont diminués (Lebiedzinska et al., 2010).

Les chaînes augmentent en ROS simultanément. Une fois que nous avons réalisé que l'augmentation du calcium cytosolique dans les spermatozoïdes humains entraînait le MPT et, par conséquent, une augmentation de la production de ROS, nous avons déterminé quels types de ROS étaient produits dans ces conditions expérimentales. L'effet nul de DPI, TEMPOL et PBN suggère qu'une autre espèce réactive est le principal producteur de superoxyde dans les spermatozoïdes humains induits par MPT (Treulen et al., 2015).

En revanche, l'effet de piégeage de la NAC dans les spermatozoïdes avec une production accrue de ROS après une surcharge en calcium cytosolique montre que la principale espèce réactive produite par l'induction de MPT dans ces conditions expérimentales est la vapeur

### **Chapitre 3 : Résultats et Discussion**

d'eau. Il est rapporté que l'ajout de faibles niveaux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro avait un effet physiologique et protégeait l'ADN du sperme de la fragmentation, mais que des niveaux élevés de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avaient l'effet inverse (Aitken et al., 1998).

De même, l'incubation in vitro de spermatozoïdes avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a induit une fragmentation de l'ADN de manière dose-dépendante. Après avoir observé qu'une augmentation du calcium cytosolique dans le sperme humain induit le MPT et augmente ainsi la production de ROS et que la principale espèce réactive produite par l'induction du MPT est H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous avons évalué l'effet du MPT sur la fragmentation de l'ADN (Kemal Duru et al., 2000) ; (Villani et al., 2010).

Il a été observé que l'incubation d'ionomycine avec du sperme entraîne une fragmentation de l'ADN de manière dose-dépendante. L'absence d'effet de l'ionomycine 0,5 mM sur la fragmentation de l'ADN semble confirmer une ouverture transitoire des pores associée à des niveaux physiologiques de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kemal Duru et al., 2000) ; (Villani et al., 2010).

Inversement, l'augmentation significative de la fragmentation de l'ADN à des concentrations plus élevées d'ionomycine serait associée à une ouverture à long terme de mPTP et donc à une augmentation de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Fait intéressant, il a été rapporté que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induisait une augmentation de la concentration de calcium cytosolique en épuisant les réserves de calcium intracellulaires ; Par conséquent, le MPT peut être associé à une augmentation de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui à son tour stimulerait le MPT en induisant une augmentation du calcium cytosolique. Ce processus pourrait finalement conduire à une augmentation globale du stress oxydatif dans les spermatozoïdes (Bejarano et al., 2008).

Les résultats de l'article suggèrent qu'il existe des pores dans la membrane interne des spermatozoïdes humains, qui s'ouvrent en réponse à une augmentation des ions calcium. Le DCm intact et le DCm diminué ont été associés à une production accrue de ROS dans cette étude. Les deux conditions étaient associées à une ouverture transitoire des pores et à une ouverture mPTP à long terme. La principale espèce active produite par l'induction du MPT est H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui, à fortes concentrations, est responsable de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes observée d'après l'histogramme. Dans cette étude ils proposent que l'ouverture de MPT par mPTP soit un mécanisme important d'augmentation des ROS et de fragmentation de l'ADN qui n'a pas encore été décrit dans les spermatozoïdes humains. Empêcher l'ouverture de la protéine de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) peut être une stratégie efficace pour prévenir la fragmentation de l'ADN par le stress oxydatif à médiation mitochondriale dans les spermatozoïdes humains (Treulen et al., 2015).

### 2 Impact du ROS sur la motilité et le nombre des spermatozoïdes

#### ❖ Résultats :

D'après cette étude (Lobascio et al., 2015), la mesure des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le sperme fait partie intégrante de l'analyse du sperme, mais sa véritable signification reste encore inconnue. Dans cette étude, Ils ont corrélé le nombre de leucocytes séminaux avec divers paramètres séminaux. Ils ont trouvé également une corrélation négative entre le nombre de leucocytes et la concentration de spermatozoïdes ( $r_s = 0,22$  ;  $p = 0,01$ ) et la motilité ( $r_s = 0,20$  ;  $p = 0,02$ ).

D'autre part, une corrélation positive entre le nombre de leucocytes et les deux graines ROS ( $r_s = 0,70$ ,  $p < 0,001$  ;  $n = 125$ ) et le nombre de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN ( $r_s = 0,43$ ,  $p = 0,032$  ;  $n = 25$ ) trouvé. Cependant, seules des tendances positives ont été observées entre les ROS et le nombre de spermatozoïdes et la fragmentation de l'ADN détectés par TUNEL. De plus, ce dernier n'était pas corrélé à la perte du potentiel de membrane mitochondriale (MMP) des spermatozoïdes (10 % contre 35 %,  $r_s = 0,25$ ,  $p = 0,08$  ;  $n = 50$ ).

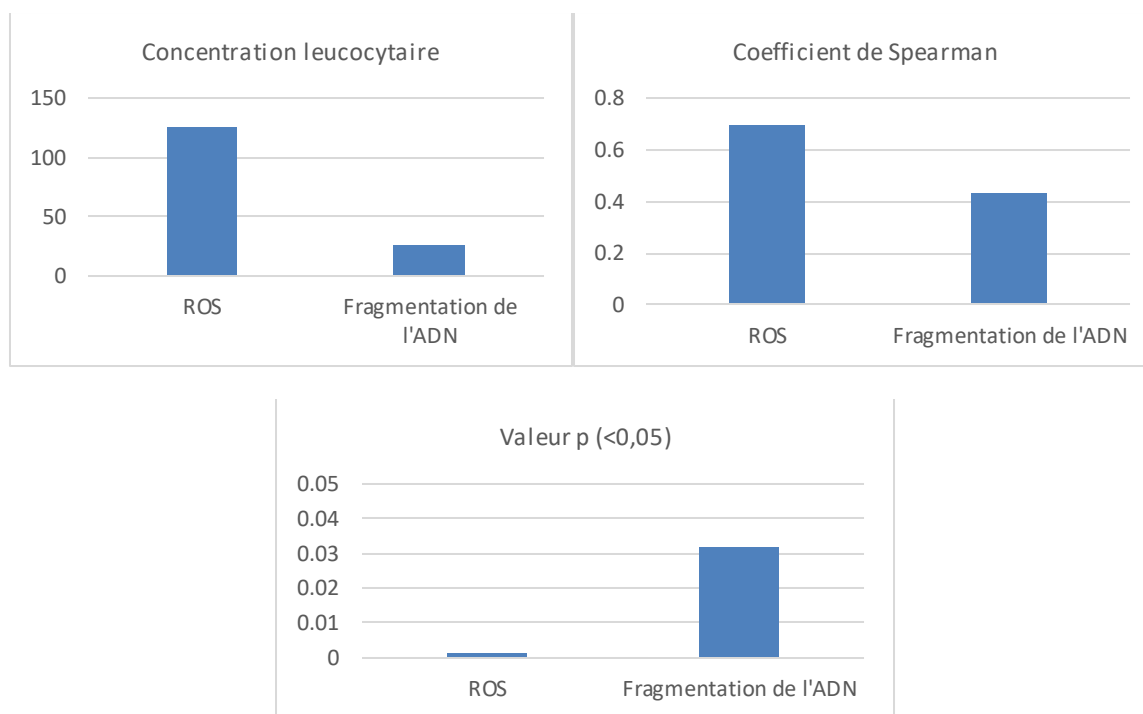


Figure 46 : Analyses de corrélation entre la concentration de leucocytes, la motilité des spermatozoïdes, la concentration, les ROS séminales et le nombre de spermatozoïdes présentant une fragmentation de l'ADN.

#### ❖ Discussion :

Divers paramètres du sperme ont été corrélés avec le nombre de leucocytes du sperme. Une corrélation négative a été observée entre le nombre de leucocytes et la concentration et la

### **Chapitre 3 : Résultats et Discussion**

motilité des spermatozoïdes, et une corrélation positive a été observée entre le nombre de leucocytes et les ROS du sperme et le nombre de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN. De plus, des numérations de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN détectées dans ROS et TUNEL ont été trouvées.

Les données confirment les observations précédentes. La présence d'un grand nombre de leucocytes dans le sperme affecte négativement un certain nombre de paramètres spermatiques associés aux cas d'infertilité, il est possible qu'une diminution du nombre de spermatozoïdes et une diminution de la motilité, par exemple, soit une conséquence directe et/ou résultat indirect d'une augmentation du nombre de leucocytes, qui serait la principale source de ROS séminales (Said et al., 2005). Cependant, absence d'une corrélation claire entre les ROS et la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, et les spermatozoïdes avec ADN endommagé et perte de MMP, suggèrent que les ROS produites par les leucocytes pourraient ne pas être la seule cause de dommages à l'ADN dans les spermatozoïdes et que les voies apoptotiques intrinsèques dépendantes des mitochondries pourraient n'ont pas d'impact majeur sur la fragmentation de l'ADN du sperme (Lobascio et al., 2015).

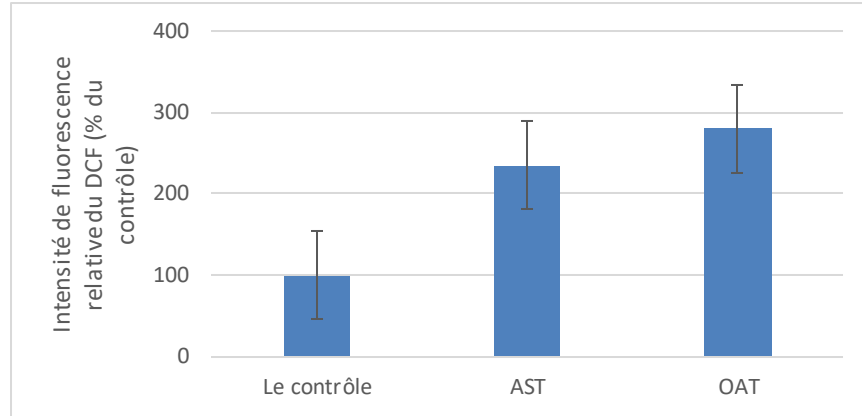
Les résultats des études antérieures montrant que la production de ROS du sperme quantifiée par des techniques de chimioluminescence est corrélée négativement avec la motilité des spermatozoïdes (Aitken, 1989) ; (Whittington & Ford, 1998). Il est possible qu'une production accrue de ROS altère la motilité des spermatozoïdes par deux mécanismes différents : Premièrement, les ROS stimulent l'oxydation membranaire des spermatozoïdes, réduisant leur flexibilité et la motilité de leur queue. Les membranes des spermatozoïdes sont vulnérables à ce type de dommages car elles contiennent beaucoup d'acides gras insaturés. Deuxièmement, il faut une nouvelle approche pour résoudre ce problème.

### **3 Effet du ROS sur l'induction du l'apoptose précoce**

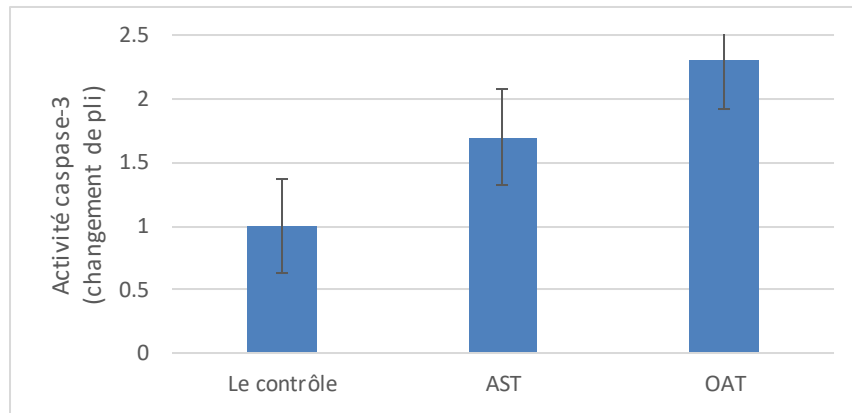
#### **❖ Résultats :**

Une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) du niveau de ROS séminal avec une diminution des scores TAS a été observée dans les groupes infertiles par rapport aux normozoospermiques. Les mâles infertiles ont montré des niveaux élevés ( $p < 0,001$ ) de 4-HNE, de fragmentation de l'ADN et d'activité de la caspase-3 par rapport aux normozoospermiques, ce qui était positivement corrélé à l'augmentation des niveaux de ROS séminales et négativement au score TAS dans les groupes étudiés. Le niveau de ROS séminal était significativement inversement corrélé aux paramètres du sperme. De plus, une forte corrélation négative entre la fragmentation de l'ADN, la LPO (Lipid peroxidation), l'activité de la caspase-3 et les paramètres séminaux a été observée.

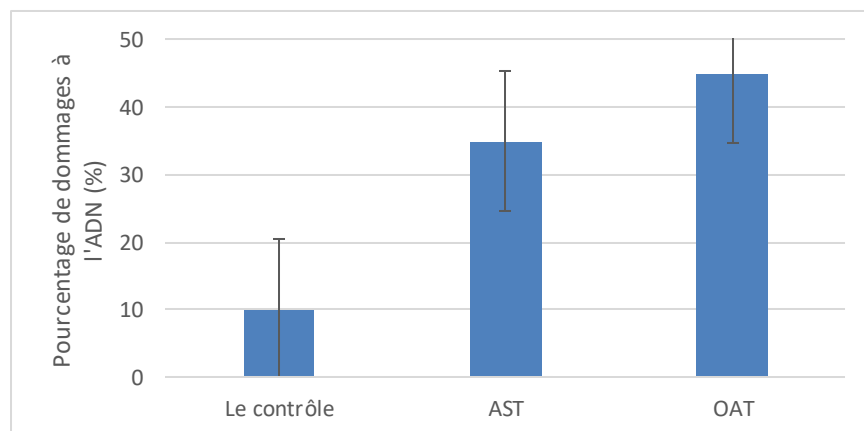
### Chapitre 3 : Résultats et Discussion



**Figure 47 : Comparaison des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène séminal (ROS) entre les groupes fertiles normozoospermiques (témoin) et asthénozoospermiques (AST) et oligoasthénotérozoospermies (OAT).**



**Figure 48 : Comparaison de l'activité de la caspase-3 dans les lysats de spermatozoïdes issus des groupes fertiles normozoospermiques (témoins) et asthénozoospermiques (AST) et oligoasthénotérozoospermies (OAT).**



**Figure 49 : Fragmentation de l'ADN dans le sperme humain déterminée par le test TUNEL.**

#### ❖ Discussion :

Les altérations oxydatives des bases azotées par les espèces réactives de l'oxygène peuvent endommager directement l'ADN des spermatozoïdes. De plus, une mauvaise protamination des spermatozoïdes, qui est courante chez les hommes infertiles, rend leur ADN de sperme plus susceptible d'être endommagé par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Ni et al., 2016). Grâce à l'activation des caspases, de graves dommages à l'ADN provoque une fragmentation de l'ADN, un indicateur de l'apoptose. L'étude donc a révélé que les spermatozoïdes des patients infertiles avaient des quantités plus élevées de caspase 3, le dernier exécutant de l'apoptose, que les spermatozoïdes des patients infertiles.

Bien que l'apoptose soit encore nécessaire dans une certaine mesure pour la délivrance réussie de spermatozoïdes sains, on pense que l'apoptose dérégulée chez les spermatozoïdes matures joue un rôle dans le développement de l'état sous-fécondé et est associée à la fragmentation (Engel et al., 2018) ; (Nakidkina et al., 2019). Par rapport au groupe fertile, la proportion de fragmentation de l'ADN était plus élevée dans les groupes OAT et AST. L'augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes dans le groupe OAT par rapport au groupe AST suggère que les spermatozoïdes morphologiquement aberrants peuvent être plus sensibles aux ruptures de brins d'ADN car ils ont plus de cytoplasme restant et moins de protection antioxydante (Rocha et al., 2015).

Cette étude a trouvé une corrélation positive significative entre la concentration inférieure de spermatozoïdes, la motilité des spermatozoïdes et le nombre de spermatozoïdes ayant une morphologie normale et une activité caspase-3, qui est associée à la OS du sperme, à l'apoptose et aux paramètres du sperme. Cette association est similaire à celle trouvée dans d'autres études, qui ont révélé qu'une concentration et une motilité plus faibles des spermatozoïdes étaient causées par des taux plus élevés d'apoptose (Nakidkina et al., 2019).

L'infertilité dans les groupes de patients peut être causée par la corrélation négative entre la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et la morphologie normale des spermatozoïdes et la motilité globale (Aydos et al., 2015) ; (Al Omrani et al., 2018). La corrélation positive significative entre l'OS du sperme, la LPO et la fragmentation de l'ADN trouvée dans ce travail soulève la possibilité qu'une production élevée de ROS soit responsable des dommages observés à la LPO et à l'ADN.

En plus de réduire les taux de conception, la plus grande sensibilité des spermatozoïdes aux dommages à l'ADN causés par le système d'exploitation peut également entraîner des embryons de mauvaise qualité, ce qui peut entraîner des malformations congénitales et même des maladies infantiles (Bisht et al., 2017) ; (Agarwal et al., 2017). La morphologie anormale des spermatozoïdes causée par la préservation du cytoplasme restant dans l'OAT s'est avérée favoriser la production de niveaux pathogènes de ROS endogènes dans le sperme (Majzoub et al., 2017).

### **Chapitre 3 : Résultats et Discussion**

Ainsi, les individus atteints d'OAT présentait des niveaux plus élevés de ROS, d'apoptose et de fragmentation de l'ADN du sperme par rapport aux individus atteints d'AST. L'environnement à haute température en Arabie saoudite pendant la majeure partie de l'année augmente la température dans le scrotum et entraîne des dommages induits par le système d'exploitation sur les macromolécules de sperme, réduisant ainsi la qualité du sperme, qui est l'une des raisons de l'infertilité masculine idiopathique dans la population saoudienne (Alasmari et al., 2018).

Il y a eu une corrélation positive significative entre la production de Formazan et l'augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, ce qui correspond à la capacité bien établie des ROS à endommager l'ADN des spermatozoïdes. Les radicaux libres peuvent induire la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes par deux mécanismes. Premièrement, les ROS peuvent attaquer directement les bases puriques et pyrimidiques, ainsi que le squelette d'ADN désoxyribose des spermatozoïdes. Deuxièmement, les dommages causés par les radicaux libres déclenchent la fragmentation par endonucléase apoptotique de l'ADN du sperme (Moustafa et al., 2004). Il a été rapporté que les hommes infertiles produisant des niveaux élevés de ROS présentent des niveaux significativement plus élevés d'apoptose précoce des spermatozoïdes (annexine V +, PI-) par rapport aux hommes infertiles avec de faibles niveaux de production de ROS.

Étant donné que la production de Formazan était fortement corrélée à l'apoptose précoce dans cette étude, il est probable que l'augmentation observée de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes observée sous un stress oxydatif accru soit le résultat net de l'attaque des ROS et du clivage apoptotique de l'ADN par l'endonucléase.



# **Conclusion Générale**

## Conclusion générale

Les problèmes d'infertilité masculine provoqués par un dysfonctionnement du sperme sont considérés comme l'une des principales causes d'infécondité involontaire dans le monde moderne. Les dommages à l'ADN sont l'une des principales causes de réduction de la capacité de fécondation, puisque la structure cellulaire des spermatozoïdes empêche l'attaque enzymatique de l'ADN, la majorité de ces dommages se produisent de manière non enzymatique et en grande partie à cause des ROS générées dans les cellules. Une activité mitochondriale élevée et une quantité relativement plus élevée de génération de ROS sont nécessaires pour les activités fonctionnelles propres aux spermatozoïdes, telles que, par exemple, la motilité énergétique. Des fragments d'ADN plus élevés ont été trouvés chez les hommes avec un ROS élevé et une faible capacité antioxydante dans le plasma séminal, fournissant un soutien suffisant pour le lien entre les dommages à l'ADN du sperme et ces facteurs.

Le stress oxydatif a été identifié comme l'une des principales causes de l'infertilité masculine. Cela peut provoquer un dysfonctionnement des spermatozoïdes. Conditions associées à des niveaux élevés d'oxygène et aux dommages cellulaires causés par les radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS). Ceci est cohérent avec l'idée que les mécanismes associés à l'oxydation des radicaux libres peuvent avoir un impact significatif sur les dommages non enzymatiques à l'ADN. Grâce à cette étude, nous espérons en savoir plus sur les causes des dommages aux organes reproducteurs chez les hommes et sur la manière dont ils endommagent l'ADN des spermatozoïdes.

Nous avons examiné des recherches antérieures menées par d'autres chercheurs qui ont révélé diverses causes sous-jacentes du stress oxydatif, notamment la qualité du sperme, la présence d'un nombre important de leucocytes dans le sperme, la cryoconservation, l'exposition aiguë aux champs de radiofréquence, la production de Formazan et de nombreux autres facteurs. Cependant, au cours de nos recherches, nous avons identifié un certain nombre de facteurs significatifs qui ont une influence négative des ROS sur la fragmentation de l'ADN nucléaire des spermatozoïdes chez les hommes infertiles.

L'un de ces éléments est la quantité de leucocytes dans le sperme. Nous avons trouvé un lien entre les leucocytes du sperme et les dommages oxydatifs de l'ADN dans le sperme. Cela, les variables clés du sperme, comme la concentration et la motilité des spermatozoïdes, sont affectées négativement par la présence d'un nombre élevé de leucocytes dans le sperme. La principale source de ROS et la cause de la fragmentation de l'ADN du sperme sont les leucocytes. Les leucocytes produisent des quantités importantes de ROS, mais leur présence dans le sperme n'était pas associée aux indicateurs traditionnels de dommages aux spermatozoïdes, tels que la motilité et les dommages des spermatozoïdes.

Cependant, il y avait une corrélation significative entre une motilité plus faible des spermatozoïdes et une activité accrue de la caspase-3 et une fragmentation de l'ADN plus élevée. En plus de la formation de Formazan, qui a une forte corrélation négative avec la motilité des

spermatozoïdes, cette découverte a une corrélation négative entre la motilité des spermatozoïdes et la production de spermatozoïdes ROS, telle que mesurée par chimiluminescence. Conformément à d'autres études montrant. En revanche, la qualité du sperme était fortement inversement liée aux dommages oxydatifs des spermatozoïdes et à l'apoptose médiée par la caspase-3. Cette corrélation suggère que les dommages oxydatifs et l'apoptose sont responsables de la qualité inférieure du sperme et de la fragmentation ultérieure de l'ADN du sperme.

Le dernier facteur serait la cryoconservation car elle augmentait significativement les pourcentages de cellules positives pour la caspase, la 8OHdG et l'ADN de sperme fragmenté. De plus, après cryoconservation et séparation à l'aide de DGC, il a été découvert que la proportion de fragmentation de l'ADN du sperme était positivement corrélée au pourcentage de 8OHdG. En outre, nous avons vu que le sperme d'éjaculat des hommes infertiles avait de plus grandes concentrations de 8-OHdG, ce qui nous a amenés à conclure que les dommages à l'ADN des spermatozoïdes sont significativement liés à l'infertilité masculine et que le 8-OHdG est un indicateur sensible des dommages oxydatifs à l'ADN.

L'infertilité masculine est étroitement liée aux dommages à l'ADN des spermatozoïdes et le 8-OHdG est un indicateur sensible des dommages oxydatifs à l'ADN.

# **Bibliographie**

## Références Bibliographiques

**Agarwal A., G. Virk, C. Ong, and S. S. Du Plessis,** “*Effect of oxidative stress on male reproduction,*” *The World Journal of Men’s Health*, vol. 32, no. 1, pp. 1–17, 2014.

**Agarwal A., Makker K., Sharma R.:** *Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility - an update.* *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2008, 1: 2-11.

**Agarwal, A., Saleh, RA et Bedaiwy, MA (2003).** *Rôle de l'oxygène réactif reproduction féminine et la procréation assistée.* *Biomédecine reproductive en ligne*, 9, 338–347.

**Aitken RJ and Krausz C, 2001:** *Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome Reproduction* 122 497–506.

**Aitken RJ, Baker MA.** *Oxidative stress, sperm survival and fertility control.* *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250:66–9.

**Aitken RJ, Bennetts LE, Sawyer D, Wiklendt AM, King BV.** *Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline.* *Int J Androl* 2005; 28:171–9.

**Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K and Richardson DW, 1992:** *Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors* *Journals of Reproduction and Fertility* 94 451–462

**Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI:** *Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria.* *Hum Reprod* 2010, 25:2415-2426.

**Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS 1998:** *Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa.* *Biol Reprod*; 59:1037 – 1046.

**Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA.** *Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health.* *J Androl* 2012; 33:1096 – 1106

**Aitken RJ, West KM.** *Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients.* *Int J Androl* 1990; 13:433 – 451.

**Aitken, R. J. (1989)** *The role of free oxygen radicals and sperm function.* International Journal of Andrology 12, 95–97

**Aitken, R.J. and West, K.M. (1990)** *Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients.* Int. J. Androl., 13, 433–451.

**Aitken, RJ, De Iuliis, GN et McLachlan, RI (2009).** *Biologique et clinique l'importance des dommages à l'ADN dans la lignée germinale mâle.* Journal international d'andrologie, 32, 46–56.

**Ajayi, A. F., & Akhigbe, R. E. (2020).** *Codeine-induced sperm DNA damage is mediated predominantly by oxidative stress rather than apoptosis.* Redox Report, 25 (1), 33-40.

**Akopova OV, Kolchynskaya LY, Nosar VY, Smyrnov AN, Malisheva MK, Man'kovskaia YN, Sahach VF 2011:** *The effect of permeability transition pore opening on reactive oxygen species production in rat brain mitochondria.* Ukr Biokhim Zh; 83:46 – 55.

**Aksoy H, Aksoy Y, Ozbey I, Altuntas I, Akcay F.** *The relationship between varicocele and semen nitric oxide concentrations.* Urol Res 2000; 28: 357–359.

**Aktan, G., Dogru-Abbasoglu, S., Kucukgergin, C., Kadioglu, A., Ozdemirler Erata, G., & Kocak-Toker, N. (2013).** *Mystère de l'infertilité masculine idiopathique : Le stress oxydatif est-il un risque réel ? Fertilité et stérilité,* 99, 1211–1215.

**Al Omrani B, Al Eisa N, Javed M, Al Ghedan M, Al Matrafi H, Al Sufyan H. 2018:** *Associations of sperm DNA fragmentation with lifestyle factors and semen parameters of Saudi men and its impact on ICSI outcome.* Reprod Biol Endocrinol; 16:49.

**Alasmari W, Edris F, Albar Z, Gari A, Eskandar M, Al Fageah M, Zawawi S. 2018:** *High proportion of abnormal semen characteristics among saudi infertile couples.* Clin Med Diagn.;8:14–18.

**Alvarez, J. G., Sharma, R. K., Ollero, M., Saleh, R. A., Lopez, M. C., Thomas Jr, A. J., ... & Agarwal, A. (2002).** *Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay.* Fertility and sterility, 78(2), 319-329.

**Amann R.P. 2008:** *The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans: A Need to Revisit?* Journal of Andrology. 2008; 29(5): 469-487.

**Angela, B., Javurek A. B., Spollen W. G., Ali A. M, Johnson S. A, Lubahn D. B, Bivens N. J, Bromert K. H, Ellersieck M. R, Givan S. A, Rosenfeld CS.** *Discovery of a Novel Seminal Fluid Microbiome and Influence of Estrogen Receptor Alpha Genetic Status.* Sci Rep. (146): 230-270p

**Avendano, C., Mata, A., Sarmiento, C. A. S., & Doncel, G. F. (2012).** *Use of laptop computers connected to internet through Wi-Fi decreases human sperm motility and increases sperm DNA fragmentation. Fertility and sterility, 97 (1), 39-45.*

**Aydos OS, Yükselten Y, Kaplan F, Sunguroğlu A, Aydos K. 2015:** *Analysis of the correlation between sperm DNA integrity and conventional semen parameters in infertile men. Turk J Urol. 2015; 41:191–197.*

**Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW et al 2005:** *Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. Nature; 434:658 –662.*

**Balhorn R, 1982:** *A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. J Cell Biol93, 298–305.*

**Barratt CLR, Aitken RJ, Björndahl L, Carrell DT, De Boer P, Kvist U, Lewis SEM, Perreault S D, Perry MJ, Ramos L, Robaire B, Ward S, and Zini A 2010:** *Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications—apposition report Human Reproduction 25 824–838.*

**Barroso, G., Morshedi, M., & Oehninger, S. (2000).** *Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Human reproduction, 15 (6), 1338-1344.*

**Batandier C, Lerverve X, Fontaine E. 2004:** *Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. J Biol Chem; 279:17197– 17204.*

**Bejarano I, Lozano GM, Ortiz A, Garcia JF, Paredes SD, Rodriguez AB, Pariente JA 2008:** *Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. Fertil Steril; 90:1340 – 1347. Bernardi P, Forte M. The mitochondrial permeability transition pore. Novarti*

**Bellver J, Meseguer M, Muriel L, Garcia-Herrero S, Barreto MA, Garda AL, et al. Y chromosome microdeletions, sperm DNA fragmentation and sperm oxidative stress as causes of recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. Hum Reprod 2010; 25:1713–21.**

**Bellver, J., Meseguer, M., Muriel, L., Garcia-Herrero, S., Barreto, M. A. M., Garda, A. L., ... & Garrido, N. (2010).** *Y chromosome microdeletions, sperm DNA fragmentation and sperm oxidative stress as causes of recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. Human reproduction, 25 (7), 1713-1721.*

**Benchai, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., & Guérin, J. F. (2003).** *La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes diminue le taux de grossesse chez un technique de procréation assistée.* *Reproduction humaine*, 18, 1023–1028.

**Berling S, Wölner-Hansser P** *No evidence of deteriorating semen quality among men in infertile relationships during the last decade: a study of males from Southern Sweden.* *Hum Reprod.* 1997; 12:1002-1005

**Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. Nat Rev Urol. 2017; 14:470–485.** Agarwal A, Cho CL, Esteves SC, Majzoub A. *Current limitation and future perspective of sperm DNA fragmentation tests.* *Transl Androl Urol.* 2017;6: S549–S552.

**Boivin J., Bunting L., Collins J.A., Nygren K.G. 2007:** *International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care.* *Human Reproduction.* 2007; 22: 1506-12.

**Box HC, Dawidzik JB, Budzinski EE.** *Free radical-induced double lesions in DNA.* *Free Radic Biol Med* 2001; 31:856–68.

**Brewer L, Corzett M, Lau EY and Balhorn R, 2003:** *Dynamics of protamine I binding to single DNA molecules.* *J Biol Chem* 278, 42403–42408

**Brewer LR, Corzett M and Balhorn R, 1999:** *Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule.* *Science* 286, 120–123.

**Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE.** *Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years.* *BMJ.* 1992; 305:609-613

**Chakroun Feki, N., Zribi, N., Eleuch, H., Gdoura, R., Sellami, A., Bahloul, A., ... & Keskes Ammar, L. (2008).** *Intérêt de l'étude de l'oxydation de l'ADN des spermatozoïdes par marquage de la 8-oxo-guanine en cytométrie en flux chez l'homme infertile.* *Andrologie*, 18 (3), 197-205.

**Chantalat, L., Nicholson, JM., Lambert, SJ., Reid, AJ., Donovan, MJ., Reynolds, CD., Wood, CM. and Baldwin, JP. (2003).** *Structure of the histone-core octamer in KCl/phosphate crystals at 2.15 Å resolution.* *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59, 1395-1407

**Charriaut-Mariangue, C. and Ben-Ari, Y. (1995)** *A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis.* *NeuroReport*, 7, 61–64.



**Ciereszko A, Wolfe TD, Dabrowski K.** *Analysis of DNA damage in sea lamprey (Petromyzon marinus) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir.* Aquat Toxicol 2005; 73:128–38

**Clapier, CR., Chakravarthy, S., Petosa, C., Fernandez-Tornero, C., Luger, K. and Muller, CW. (2008).** *Structure of the Drosophila nucleosome core particle highlights evolutionary constraints on the H2A-H2B histone dimer.* Proteins 71, 1-7

**Clermont Y, 1972:** *Kinetics of Spermatogenesis in Mammals: Seminiferous Epithelium Cycle and Spermatogonial Renewal.* Physiological Reviews. 1972; 52(1): 198-236.

**Cornwall G.A. 2009:** *New insights into epididymal biology and function.* Human Reproduction Update.2009; 15(2): 213-227.

**Corzett M, Lau EY, Brewer L, and Balhorn R, 2002:** *Dynamics of protamine I binding to single DNA molecules.* J Biol Chem 278, 42403–42408.

**Coughlan C, Clarke H, Cutting R, Saxton J, Waite S, Ledger W, et al.** *Sperm DNA fragmentation, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage.* Asian J Androl 2015; 17:681–5.

**Dadoune, J. P. (2006).** *Biologie de la reproduction humaine.* Ellipses.

**De Iuliis GN, Newey RJ, King BV, Aitken RJ.** *Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro.* PLoS One 2009;4: e6446.

**De Krester, 2007:** *D.M. Endocrinology of the Male Reproductive System.* Chapter 1, 2007, Endotext.com

**Dorostghoal, M., Kazeminejad, S. R., Shahbazian, N., Pourmehdi, M., & Jabbari, A. (2017).** *Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men.* Andrologia, 49 (10), 10.1111

**Dupont C et al, 2013:** *Impact of maternal hyper hyperlipidic hypercholesterolaemic anemia diet on male reproductive organs and testosterone concentration in rabbits.* J Dev Orig Health Dis 2014

**E. Blanc, P. Meria, O. Cussenot., 1998 :** *Anatomie chirurgicale des organes génitaux masculins externes.* EMC Techniques chirurgicales – Urologie, 41-390

**Eddy EM. The spermatozoon. In: Knobil E, Neil J, editors.** *The physiology of reproduction.* New York: Raven Press; 1994:3–54

**Elbardisi, H., Finelli, R., Agarwal, A., Majzoub, A., Henkel, R., & Arafa, M. (2020).** *Predictive value of oxidative stress testing in semen for sperm DNA fragmentation assessed by sperm chromatin dispersion test.* *Andrology*, 8 (3), 610-617.

**Engel KM, Springsguth CH, Grunewald S. 2018:** *What happens to the unsuccessful spermatozoa?* *Andrology*; 6:335–344.

**Erenpreiss J., Hlevicka S., Zalkalns J., Erenpreisa J.:** *Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples.* *J. Androl.*, 2002, 5: 717-723

**Espinoza JA, Paasch U, Villegas JV 2009b:** *Mitochondrial membrane potential disruption pattern in human sperm.* *Hum Reprod*; 24:2079 – 2085.

**Evenson DP, Larson KL, and Jost LK, 2002:** *Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques* *Journal of Andrology* 32 25-45

**Evenson, DP et Wixon, R. (2008).** *Analyse des données de deux études de fertilité in vivo utilisant la fragmentation de l'ADN dérivée du test de la structure de la chromatine du sperme index vs résultat de la grossesse.* *Fertilité et stérilité*, 90, 1229–1231.

**Evgeni, E., Lymberopoulos, G., Touloupidis, S. et Asimakopoulos, B. (2015)** *Fragmentation de l'ADN nucléaire du sperme et son association avec le sperme qualité chez les hommes grecs.* *Andrologie*, 47, 1166-1174.

**Fatima, S., Alwaznah, R., Aljuraiban, G. S., Wasi, S., Abudawood, M., Abulmeaty, M., ... & Aljaser, F. S. (2020).** *Effect of seminal redox status on lipid peroxidation, apoptosis and DNA fragmentation in spermatozoa of infertile Saudi males.* *Saudi Medical Journal*, 41 (3), 238.S

**Fernandez-Gonzalez R, Moreira PN, Perez-Crespo M, SanchezMartin M, Ramirez MA, Pericuesta E, et al.** *Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring.* *Biol Reprod* 2008; 78:761–72

**Foresta C, Moro E and Ferlin A, 2001:** *Y chromosome microdeletions and alterations of Spermatogenesis* *Endocrine Reviews* 22 226–239.

**Fulda S, Debatin KM 2005:** *Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic Acid.* *Neoplasia*; 7:162– 170.

**Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, Nunez G, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM 1997:** *Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors.* *Cancer Res*; 57:4956 –4964.

**Gautier CA, Giaime E, Caballero E, Nunez L, Song Z, Chan D, Villalobos C, Shen J 2012:** *Regulation of mitochondrial permeability transition pore by PINK1.* Mol Neurodegener; 7:22

**Gavella et Lipovac, 1992 ; Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA.** *Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction.* Fertil Steril 2003; 79:829 – 843

**Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM and Zalensky AO, 2000:** *Human sperm telomere-binding complex involves histone h2b and secures telomere membrane attachment.* J Cell Biol 151, 1591–1598.

**Godwin I, 2004:** *Cambridge guide to infertility management and assisted reproduction.* Cambridge University Press, UK.

**Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G. et al. (1994)** *Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques.* Lab. Invest., 71, 219.

**Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ.** *Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function.*

**Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecky, B., Koudelka, H. et al. (1995)** *In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note.* Hepatology, 21, 1465–1468.

**Grijalba MT, Vercesi AE, Schreier S 1999:** *Ca<sup>2+</sup>-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca<sup>2+</sup>-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain.* Biochemistry; 38:13279– 13287.

**Hauser R, Meeker JD, Singh NP, Silva MJ, Ryan L, Duty S and Calafat AM, 2007:** *DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites* Human Reproduction 22 688–695

**Homa, S. T., Vassiliou, A. M., Stone, J., Killeen, A. P., Dawkins, A., Xie, J., ... & Ramsay, J. W. (2019).** *A comparison between two assays for measuring seminal oxidative stress and their relationship with sperm DNA fragmentation and semen parameters.* Genes, 10 (3), 236.

**Hosen, M. B., Islam, M. R., Begum, F., Kabir, Y., & Howlader, M. Z. H. (2015).** *Oxidative stress induced sperm DNA damage, a possible reason for male infertility.* Iranian journal of reproductive medicine, 13 (9), 525.

**Hud NV, Allen MJ, Downing KH, Lee J and Balhorn R, 1993:** *Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy.* Biochem Biophys Res Commun 193, 1347–1354.

**Hud NV, Milanovich FP and Balhorn R, 1994:** *Evidence of novel secondary structure in DNA bound protamine is revealed by raman spectroscopy.* Biochemistry 33, 7528–7535.

**Humeau C and Arnal F, 2005 :** *Reproduction et développement.* Editions saurampsmedical. Pages61-80

**Humeau C and Arnal F, 2005.** *Reproduction et développement.* Editions saurampsmedical. Pages 61-80.

**Iommiello, V. M., Albani, E., Di Rosa, A., Marras, A., Menduni, F., Morreale, G., ... & Levi-Setti, P. E. (2015).** *Ejaculate oxidative stress is related with sperm DNA fragmentation and round cells.* International journal of endocrinology, 2015.

**Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA and Aitken RJ,2000:** *DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality* Journal of Andrology 21 33–44.

**J Androl 1996; 17:276– 287. Huang J, Zhong Y, Fang X, Xie Q, Kang X, Wu R, Li F, Xu X, Lu H, Xu L et al.** *Hepatitis B virus s protein enhances sperm apoptosis and reduces sperm fertilizing capacity in vitro.* PLoS One 2013;8: e68688

**Jian Pei Ph., 2005:** *Quantitative Evaluation of Spermatozoa Ultrastructure after Acupuncture Treatment for Idiopathic Male Infertility.* Fertility and Sterility, 84(1):141-147.

**Kalmbach, K. H., Antunes, D. M. F., Dracxler, R. C., Knier, T. W., Seth-Smith, M. L., Wang, F., ... & Keefe, D. L. (2013).** *Telomeres and human reproduction.* Fertility and sterility, 9 (1), 23-29

**Kamkar, N., Ramezanali, F., & Sabbaghian, M. (2018).** *The relationship between sperm DNA fragmentation, free radicals and antioxidant capacity with idiopathic repeated pregnancy loss.* Reproductive Biology, 18 (4), 330-335.

**Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TI, Liao TL, Wei YH:** *Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility.* Fertil Steril 2008, 89:1183-1190

**Keltz Jet al., 2010:** *Overweight men: clinical pregnancy after ART is decreased in IVF but not in ICSI cycles.* J Assist Reprod Genet, 2010

**Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S 2000:** *Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa.* Fertil Steril; 74:1200 – 1207.

**Khadem N, Poorhoseyni A, Jalali M, Akbary A, Heydari ST.** *Sperm DNA fragmentation in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions.* Andrologia 2014; 46:126–30.

**Khosravi, F., Valojerdi, MR, Amanlou, M., Karimian, L. et Abolhassani, F (2014).** *Relation entre les espèces réactives séminales d'azote et d'oxygène et capacité antioxydante totale avec fragmentation de l'ADN du sperme chez les couples de carreaux inférents avec des paramètres de sperme normaux et anormaux.* Andrologie, 46, 17–23.

**Khosravi, F., Valojerdi, MR, Amanlou, M., Karimian, L. et Abolhassani, F. (2014).** *Relation entre les espèces réactives séminales d'azote et d'oxygène et capacité antioxydante totale avec fragmentation de l'ADN du sperme chez les couples de carreaux inférents avec des paramètres de sperme normaux et anormaux.* Andrologie, 46 17–23.

**Kimura Y et Yanagimachi R, 1995:** *Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring.* Development 121, 2397–2405

**Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, Rawson DM, Holt WV.** *Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (Misgurnus fossilis) embryos derived from cryopreserved sperm.* Theriogenology 2004; 61:1661–73.

**Kosower NS, Katayose H and Yanagimachi R, 1992:** *Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei* Journal of Andrology 13 342–348

**Kumaroo KK, Jahnke G and Irvin JL, 1975:** *Changes in basic chromosomal proteins during spermatogenesis in the mature rat* Archives of Biochemistry and Biophysics 168 413- 424

**Lebiedzinska M, Karkucinska-Wieckowska A, Giorgi C, Karczmarewicz E, Pronicka E, Pinton P, Duszynski J, Pronicki M, Wieckowski MR. 2010:** *Oxidative stress-dependent p66Shc phosphorylation in skin fibroblasts of children with mitochondrial disorders.* Biochim Biophys Acta; 1797:952 – 960.

**Lemkecher, T., Dartigues, S., Vaysse, J., Kulski, O., Barraud-Lange, V., Gattegno, L., & Wolf, J. P. (2005).** *Leucospermie, stress oxydatif et fertilité masculine : certitudes et hypothèses.* \*Gynécologie obstétrique & fertilité\*, \*33\*(1-2), 2-10.

**LHERMITE A (Maître de CH à la faculté des S de N et ancien B des H).** *L'ovaire.* Enseignement de Biologie Animale destinés aux étudiants de la faculté de Sciences de Nantes. [Internet]. [Cité 9 nov 2016]. Disponible sur : **Error! Hyperlink reference not valid.**

**Liu P.Y. et Handelsman D.J.2003:** *The present and future state of hormonal treatment for male infertility.* Human Reproduction Update. 2003; 9(1): 9-23.

**Lobascio, A. M., De Felici, M., Anibaldi, M., Greco, P., Minasi, M. G., & Greco, E. (2015).** *Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa.* Andrology, 3 (2), 265-270.

**Lopes S, Sun J, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF:** *Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection.* Fertil Steril 1998, 69:528-532.

**Luger, K. and Richmond, TJ. (1998a).** *The histone tails of the nucleosome.* Curr. Opin. Genet. Dev.8, 140-146.

**Luger, K. and Richmond, TJ. (1998b).** *DNA binding within the nucleosome core.* Curr. Opin.Struct. Biol. 8, 33-40.

**Majzoub A, Agarwal A. 2017:** *Antioxidant therapy in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia.* Indian J Urol.; 33:207–214

**Manicardi, G.C., Tombacco, A., Bizzaro, D. et al. (1998)** *DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays.* Histochem. J., 30, 33–39.

**Marcon L and Boissonneault G, 2004:** *Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling* Biology of Reproduction 70 910–918

**McPherson SMG and Longo FJ, 1992:** *Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating Spermatids* Molecular Reproduction and Development 31 268–279.

**McPherson SMG and Longo FJ, 1993a:** *Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II* Developmental Biology 158 122–130.

**McPherson SMG and Longo FJ, 1993b:** *Chromatin structure–function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids* European Journal of Histochemistry37 109–128

**Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, Saad A:** *Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters.* Andrologia 2009, 41:383-386

**Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR and Zhao M, 2003:** *Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis.* Chromosoma 111, 483–488.

**Meseguer M, Martinez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohi J, Garrido N:** *The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor.* Fertil Steril 2008, 89:1191-1199

**Morris ID, 2002b:** *Sperm DNA damage and cancer treatment* International Journal of Andrology 25 255–261

**Moskovtsev S.I., Willis J., White J., Mullen J.B.:** *Leukocytospermia: relationship to sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male factor infertility.* Fertil. Steril., 2007, 3: 737-740

**Moustafa YM, Moustafa RM, Belacy A, Abou-El-Ela SH, Ali FM.** *Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid peroxide and antioxidase activities in human erythrocytes.* J Pharm Biomed Anal 2001; 26:605–8.

**Moustafa, M. H., Sharma, R. K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M. A., Thomas, A. J. Jr & Agarwal, A. (2004)** *Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility.* Human Reproduction 19, 129–138

**Muller Y. et Clos J. (1997).** *La reproduction (Gonades, gamètes et fécondation).* Edition Nathan, Paris: 9-31

**Nakamura H, Kimura T, Nakajima A, Shimoya K, Takemura M, Hashimoto K, Isaka S, Azuma C, Koyama M, Murata Y:** *Detection of oxidative stress in seminal plasma and fractionated sperm from subfertile male patients.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2002, 105:155-60

**Nakidkina AN, Kuzmina TI. 2019:** *Apoptosis in Spermatozoa and Its Role in Deteriorating Semen Quality.* Russ J Dev Biol; 50:165–172

**Ni K, Spiess AN, Schuppe HC, Steger K. 2016:** *The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis.* Andrology; 4:789–99.

**Nieschlag E, Behre HM and Nieschlag S, 2010:** *Andrology: Male reproductive health and Dysfunction.* 3rd Edn. Springer

**Ogura A, Matsuda J and Yanagimachi R., 1994:** *Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids.* Proc Natl Acad Sci USA 91, 7460–7462.

**Palermo GD, Neri QV, Cozzubbo T, Rosenwaks Z 2014:** *perspectives on the assessment of huma sperm chromatin integrey.* Fertile Sterile 2014; 102:1508-17.

**Patrick Villette 2012 :** *Ostéopathie & fertilité ; Ostéopathie à la Rochelle.*

**Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Cabrita, E., Martínez-Pastor, F., De Paz, P., & Herráez, M. P. (2009).** *Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout.* Theriogenology, 71 (4), 605-613.

**Peterson C.L. 2000:** *ATP-dependent chromatin remodeling: going mobile.* FEBS Lett., 2000, 476: 68-72

**Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F 1999:** *Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence.* Biophys J; 76:725 – 734.

**Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolese M, Paradies G 2004:** *Ca<sup>2+</sup>-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)- dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin.* J Biol Chem; 279:53103– 53108

**Pittoggi C, Zaccagnini G, Giordano R, Magnano AR, Baccetti B, Lorenzini R and Spadafora C, 2000:** *Nucleosomal domains of mouse spermatozoa chromatin as potential sites for retro position and foreign DNA integration.* Mol Reprod Dev 56, 248–251.

**Prieto MC, Maki AH and Balhorn R, 1997:** *Analysis of DNA-protamine interactions by optical detection of magnetic resonance.* Biochemistry 36, 11944– 11951.

**Quang Nhuan T. 2002 :** *À propos de l'exploration de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.* Immuno-analyse & Biologie spécialisée. 2002 ; 18 : 35-40.

**R. Jones, T. Mann, and R. Sherins,** “*Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma,*” *Fertility and Sterility*, vol. 31, no. 5, pp. 531–537, 1979.

**Rignell-Hydbom A, Rylander L, Giwercman A, Jonsson BA, Lindh C, Eleuteri P, ResciaM, Leter G, Cordelli E, Spano M and Hagmar L, 2005:** *Exposure to PCBs and p, p0-DDE and human sperm chromatin integrity* Environ Health Perspect 113 175–179.



**Rizk B, Garcia-velasco J, Sallam H and Makrigiannakis A, 2008:** *infertility and assisted Reproduction* Cambridge University Press.

**Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, et al.** *The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis.* Hum Reprod 2012; 27:2908–17.

**Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, and Mahmoud AMA, 2000:** *WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male* Cambridge University Press.

**Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave, TB, and Mellows HJ, 1993:** *WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple* Cambridge University Press.

**Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, Robbins WA and Perreault SD, 2005:** *Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality* Human Reproduction 20 2776–2783

**Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP and Perreault SD, 2007:** *GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution* Mutation Research 625 20–28

**Sá R, Cunha M, Rocha E, Barros A, Sousa M. 2015:** *Sperm DNA fragmentation is related to sperm morphological staining patterns.* Reprod Biomed Online. 2015; 31:506–515.

**Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ, Jr & Sikka SC 2005:** *Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.* Fertil Steril 83, 95–103.

**Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ, Sikka SC:** *Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.* Fertil Steril 2005, 83:95-103.

**Sakkas D and Alvarez JG, 2010:** *Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis* Fertility and Sterility 93 1027–1036

**Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG and Bianchi U, 1999:** *Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa* Journals of Reproduction and Fertility 431–37.

**Sanofi France.** Sanofi-Aventis France. <https://www.sanofi.fr/fr/>

**Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL., 2010:** *Swim-up procedure selects spermatozoa with longer telomere length.* Mutat Res. 2010; 688:88–90. [PubMed:20226199]

**Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL:** *Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm.* Fertil Steril 2010, 93:314-318.

**Sergerie M, Bleau G, Teulé R, Daudin M and Bujan L, 2005:** *Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility* Gynécologie Obstétrique & Fertilité 3389–101.

**Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G:** *Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility.* Hum Reprod 2005, 20:3446-3451

**Sergerie, M., Laforest, G., Bujan, L., Bissonnette, F., & Bleau, G. (2005).** *Fragmentation de l'ADN du sperme: valeur seuil de la fertilité masculine.* Reproduction humaine, 20, 3446–3451.

**Shamsi MB, Kumar R, Malhotra N, Singh N, Mittal S, Upadhyay AD, et al.2012:** *Chromosomal aberrations, Yq microdeletion, and sperm DNA fragmentation in infertile men opting for assisted reproduction.* Mol Reprod Dev. 2012;79(9):637-50

**Shamsi, MB, Venkatesh, S., Tanwar, M., Talwar, P., Sharma, RK, Dhawan, A., ... Dada, R. (2009).** *Intégrité de l'ADN et qualité du sperme chez les hommes à faible niveaux d'antioxydants séminaux.* Recherche sur les mutations, 665, 29–36

**Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, Agarwal A:** *TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility.* Urology 2010, 76:1380-1386.

**Shen HM, Ong C:** *Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male fertility.* Free Radic Biol Med 2000, 28:529-536

**Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE.** *The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage.* Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen 2003; 531:231–51.

**Sotolongo B, Lino E and Ward WS (2003) Ability of hamster spermatozoa to** **Tateno H, Kimura Y and Yanagimachi R, 2000:** *Sonication per se is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred* Biology of Reproduction 63 341–346.

**Spano M, Toft G, Hagmar L, Eleuteri P, Rescia M, Rignell-Hydbom A, Tyrkiel W, Zvezday V and Bonde JP, 2005:** *Exposure to PCB and p,p'-DDE in European and Inuit populations: impact on human sperm chromatin integrity* Human Reproduction 20 3488–3499

**Steele EK, McClure N, Maxwell RJ and Lewis SE, 1999:** *A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia* Molecular Human Reproduction 5 831–835.

**Suda T, Takahashi T, Golstein P and Nagata S, 1993:** *Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family* Cell 75 1169–1178.

**Tateno H, Kimura Y and Yanagimachi R, 2000:** *Sonication per se is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred* Biology of Reproduction 63 341–346

**Templeton A., 1995:** *Infertility- epidemiology, a etiology and effective management* Health Bull (Edinb) 1995, 53(5): 294-8

**Thilagavathi J, Venkatesh S, Dada R., 2012:** *Telomere length in reproduction.* Andrologia. Published online August 29, 2012.

**Thomson, L. K., Fleming, S. D., Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Zieschang, J. A., & Clark, A. M. (2009).** *Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis.* Human Reproduction, 24 (9), 2061-2070.

**Treulen, F., Uribe, P., Boguen, R., & Villegas, J. V. (2015).** *Mitochondrial permeability transition increases reactive oxygen species production and induces DNA fragmentation in human spermatozoa.* Human Reproduction, 30(4), 767-776.

**Tsunaka, Y., Kajimura, N., Tate, S. and Morikawa, K. (2005).** *Alteration of the nucleosomal DNA path in the crystal structure of a human nucleosome core particle.* Nucleic Acids Res. 33,3424-3434

**Tunc, O., Thompson, J., & Tremellen, K. (2010).** *Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress.* International journal of andrology, 33 (1), 13-21.

**Turner TT.** *On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate.* J Androl 1995; 16:292–8.

**Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiatakis, K., 2009:** *Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles.* Int. J. Environ. Res. Public Health 6, 445–462

**Van Der Ven HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S, Tånnerhoff A, Hoebbel K, Diedrich K, Krebs D and Perez-Palaez M, 1988:** *Glass wool column filtration of human semen: relation to swim-up procedure and outcome of IVF* Human Reproduction 3 85–88.

**Vilfan ID, Conwell CC and Hud NV, 2004:** *Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine.* J Biol Chem 279, 20088–20095

**Villani P, Eleuteri P, Grollino MG, Rescia M, Altavista P, Spano M, Pacchierotti F, Cordelli E 2010:** *Sperm DNA fragmentation induced by DNase I and hydrogen peroxide: an in vitro comparative study among different mammalian species.* Reproduction; 140:445– 452.

**Ward WS, 1993:** *Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa.* Biol Reprod 48, 1193–1201.

**Ward WS, Partin AW and Coffey DS, 1989:** *DNA loop domains in mammalian spermatozoa.* Chromosoma 98, 153–159.

**Ward WS. 2010:** *Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development.* Mol Hum Reprod. 2010; 16:30–6.

**White, CL., Suto, RK. and Luger, K. (2001).** *Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions.* EMBO J. 20, 5207-5218.

**Whittington, K. & Ford, W. C. (1998)** *The effect of incubation periods under 95% oxygen on the stimulated acrosome reaction and motility of human spermatozoa.* Molecular Human Reproduction 4, 1053–1057.

**Whittington, K., Ford, W.C., 1999:** *Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions.* Int. J. Androl. 22, 229–235

**Wong, W.Y., Thomas, C.M., Merkus, H.M., Zielhuis, G.A., Doesburg, W.H., Steegers-Theunissen, R.P., 2000:** *Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology.* Fertile Sterile. 74, 930–935.

**Wykes SM and Krawetz SA, 2003:** *The structural organization of sperm chromatin.* J Biol Chem 278, 29471–29477.

**Xu DX, Shen HM, Zhu QX, Xhua L, Wang QN, Chia SE and Ong CN, 2003:** *The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma* Mutation Research 534:155–163.

**Zalensky AO, Siino JS, Gineitis AA, Zalenskaya IA, Tomilin NV, Yau P and Bradbury EM 2002:** *Human testis/sperm-specific histone h2b (htsh2b).* Molecular cloning and characterization. J Biol Chem 277, 43474–43480.

**Zhang, LH, Qiu, Y., Wang, KH, Wang, Q., Tao, G. et Wang, LG (2010).** *Mesure de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes par microscopie en fond clair : Comparaison entre le test de dispersion de la chromatine des spermatozoïde et test de marquage terminal uridine nick-end.* *Fertilité et stérilité*, 94, 1027–1032.

**Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. 1993** *Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa.* *Int J Androl*; 16:183 – 188.

**Zini, A., & Libman, J. (2006).** *Domages à l'ADN des spermatozoïdes: importance clinique dans l'ère de la procréation assistée.* *Journal de l'Association médicale canadienne*, 175, 495–500.

**Zini, A., & Sigman, M. (2009).** *Les tests de dommages à l'ADN du sperme sont-ils cliniquement utiles ? Avantages et inconvénients.* *Journal d'andrologie*, 30, 219–229.

**Zribi, N., Chakroun, N. F., Elleuch, H., Abdallah, F. B., Ben Hamida, A. S., Gargouri, J., ... & Keskes, L. A. (2011).** *Sperm DNA fragmentation and oxidation are independent of malondialdehyde.* *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9 (1), 1-8.

# **Annexe**

Titre d'article	L'auteur	Résultats
<p><b>1- La transition de perméabilité mitochondriale augmente la production réactive d'espèces d'oxygène et induit la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes humains.</b></p>	<p>Favia'n Treulen<sup>1</sup>, Pamela Uribe<sup>1</sup>, Rodrigo Boguen<sup>1</sup>, and Juana V. Villegas</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analyse du MPT par cytométrie en flux et microscopie à fluorescence :            Dans les spermatozoïdes incubés uniquement avec la calcéine-AM, la fluorescence était distribuée dans tous les compartiments cellulaires.            Dans les spermatozoïdes incubés avec la calcéine-AM et le chlorure de cobalt de fluorescence calcéine, la calcéine-AM a été compartimentée exclusivement sur le milieu des spermatozoïdes où se trouvent les mitochondries            Pour induire la perméabilité IMM dans les spermatozoïdes, ils ont été incubés avec l'ionophore de calcium, l'ionomycine, avec la calcéine-AM et le chlorure de cobalt, et il a été constaté que la fluorescence médiane a disparu.            L'intensité de fluorescence dans les suspensions de spermatozoïdes incubées avec calcéine a diminué lorsque le chlorure de cobalt a été ajouté et cette diminution a été encore accentuée lorsque l'ionomycine a été ajoutée.            Lorsque l'IFM des spermatozoïdes incubés avec calcéine-AM a été comparée à l'IFM des spermatozoïdes incubés avec calcéine et cobalt, une différence significative (P, 0,001) a été observée.            Les aliquotes de spermatozoïdes traitées avec la calcéine-AM, le chlorure de cobalt et l'ionomycine ont montré une diminution globale de l'IFM, atteignant des valeurs semblables à l'IFM des spermatozoïdes à partir d'un témoin d'autofluorescence (2,65+0,68).            Les spermatozoïdes morts ont été éliminés dans chaque analyse par l'exclusion des cellules positives à l'iodure de propidium.            Les spermatozoïdes incubés dans un milieu sans calcium par chélation avec EGTA et analysés après l'ajout de calcéine-AM, de chlorure de cobalt et d'ionomycine ont montré une IMF élevée (92,75+13,72) par rapport aux</li> </ul>

spermatozoïdes analysés dans les mêmes conditions mais dans un milieu avec du calcium (2,29±0,59; P, 0,001).

Analyse du MPT par microscopie confocale au laser :

L'aliquote de perm traitée avec la calcéine-AM, le chlorure de cobalt et l'ionomycine a montré une diminution globale des IFM, atteignant des valeurs similaires à la hors-exposition des IFM de la pièce médiane.

Les intensités de fluorescence moyennes des huit ROIS mesurés toutes les 1 s pendant 15 minutes après l'addition d'ionomycine ont été tracées pour illustrer les schémas de diminution de la fluorescence individuelle dans la partie médiane des huit spermatozoïdes.

Les spermatozoïdes ont montré une diminution discontinue caractéristique de la fluorescence, avec une récupération partielle en deux phases et atteignant des valeurs minimales à 900 s

- Effet du dépôt MPT sur la viabilité, DCM et production de ROS dans les spermatozoïdes humains :

Il a été démontré que de nombreux agents ou conditions causent l'ouverture des pores dans des mitochondries isolées.

Les résultats montrent que l'incubation avec 5 mM ionomycine a induit une diminution statistiquement significative du DCM après 60 min de traitement.

L'ionomycine de 5 mM a induit une altération du DCM, cela n'a pas affecté le pourcentage de viabilité des spermatozoïdes par rapport au témoin non traité (92,42±2,29 et 91,27±2,15, respectivement) après 90 min d'incubation à 37°C. L'incubation avec 0,5 mM d'ionomycine n'a pas diminué le DCM, qui est resté inchangé jusqu'à 90 min de traitement.

Dans les cellules somatiques, le MPT par ouverture mPTP a été associé à une augmentation des niveaux de ROS.



		<p>Les niveaux intracellulaires de ROS dans les spermatozoïdes humains ont également été évalués. Nos résultats montrent que le MPT induit par 0,5 mM d'ionomycine a été associé à une augmentation de la production de ROS, qui a atteint un niveau maximal après 15 min et a été maintenu pendant les 90 min d'incubation.</p> <p>Les niveaux de ROS induits par l'ionomycine de 5 mM étaient plus du double de ceux observés dans les spermatozoïdes traités par l'ionomycine de 0,5 mM.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Détermination du type de ROS produit par l'induction de MPT dans les spermatozoïdes humains :</li> </ul> <p>Dans les suspensions de spermatozoïdes co-incubées avec l'ionomycine et avec les réactifs antioxydants DPI, TEMPOL et PBN, les niveaux de production de ROS n'étaient pas significativement différents de ceux observés avec les suspensions de spermatozoïdes traitées uniquement avec l'ionomycine.</p> <p>En revanche, dans la suspension de spermatozoïdes co-incubée avec l'ionomycine et la NAC, on a observé une diminution significative du niveau de production de ROS par rapport à la suspension de spermatozoïdes traitée uniquement avec l'ionomycine (P, 0,05).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Effet de l'induction MPT sur l'ADN :</li> </ul> <p>Les résultats ont montré que la MPT induite par l'ionomycine de 1 et 5 mM augmentait le pourcentage de cellules à ADN fragmenté par rapport au témoin non traité (P, 0,001).</p>
<p><b>2- Analyse du statut oxydatif spermatique chez des patients infertiles</b></p>	<p>H Ben Ali · F Atig · S Mehri · A Saad · M Ajina</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Groupe témoin (n=34) et sujets asthénozoospermiques (n=43) :</li> </ul> <p>Une augmentation de la concentration séminale en calcium (262,21 mg/l) et une baisse en magnésium (82,09 mg/l) chez le groupe des asthénozoospermiques, alors que les concentrations chez les témoins sont de 178 mg/l pour le calcium et de 101,21 mg/l pour le magnésium.</p>

Les différences sont significatives (ça :  $p \leq 0,001$  Mg :  $p \leq 0,008$ ) et les corrélations faibles (calcium/mobilité [ $r=0,41$  ;  $p \leq 0,001$ ] et magnésium/mobilité [ $r=0,31$  ;  $p \leq 0,05$ ]) mais significatives.

La concentration moyenne séminale en malondialdéhyde est significativement plus élevée chez le groupe des asthénozoospermiques que chez celui des témoins (3,52  $\mu\text{g/l}$  vs 2,32  $\mu\text{g/l}$ ).

Plus la concentration du malondialdéhyde augmente, plus la mobilité diminue. Ceci est confirmé par une corrélation significative ( $r=-0,24$  ;  $p \leq 0,01$ ).

- Groupe témoin ( $n=34$ ) et sujets tératozoospermiques ( $n=30$ ) :

Elévation des concentrations moyennes en zinc et en sélénium chez le groupe témoin par rapport au groupe tératospermique : de 144,01 mg/l pour les témoins et de 126,02 mg/l pour le groupe tératospermique.

La concentration moyenne du calcium séminal est plus élevée chez le groupe tératospermique que chez le groupe témoin. Alors que la concentration moyenne du magnésium est plus élevée chez ce dernier : chez le groupe témoin, les concentrations séminales du calcium et du magnésium sont respectivement de 178 mg/l et de 101,21 mg/l, alors que chez le groupe tératospermique, elles sont de 250,08 mg/l et 85,03 mg/l.

Une corrélation non significative est notée entre les concentrations du calcium et les pourcentages des formes anormales ; il en est de même pour le magnésium.

Une différence significative de concentrations moyennes en MDA entre les deux groupes (témoin et tératozoospermique). Plus la concentration séminale en MDA augmente, plus le pourcentage des formes anormales augmente ; cette corrélation est faiblement

		positive mais significative ( $r=0,19$ ; $p<0,05$ )
<b>3- Statut de stress oxydatif et fragmentation de l'ADN du sperme chez les hommes fertiles et infertiles</b>	M. Dorostghoal, SR Kazeminejad, N. Shahbazian, M. Pourmehdi, A. Jabbari5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluation du profil de sperme chez des hommes fertiles (<math>n = 105</math>) et infertiles (<math>n = 112</math>) (Deux groupes) : Une différence non significative dans l'âge des sujets fertiles et infertiles des deux groupes étudiés. Les valeurs médianes du volume de sperme et des paramètres spermatiques (concentration, motilité et morphologie) étaient significativement différentes entre le contrôle et hommes infertile.</li> <li>• Evaluation des niveaux médians de MDA, GPx et SOD dans les séminaux a fragmentation de l'ADN du plasma et du sperme des deux groupes : Niveaux significativement plus élevés de MDA dans le plasma séminal ont été observées chez les hommes infertiles par rapport aux témoins fertiles. Niveaux de l'activité GPx et SOD dans le plasma séminal étaient significativement plus faibles chez les hommes infertiles. Les hommes infertiles ont montré des sperma significativement plus élevés tozoaires à ADN fragmenté par rapport aux sujets fertiles. Des corrélations négatives significatives ont été observées entre les niveaux de MDA dans le plasma séminal et la concentration des spermatozoïdes avec Activités SOD et GPx dans le plasma séminal chez les fertiles (<math>r = \ddot{y}.229, p = .019</math> et <math>r = \ddot{y}.262 p = .007</math>) et infertiles (<math>r = \ddot{y}.338, p &lt; .001</math> et <math>r = \ddot{y}. 234 p = 0,013</math>) hommes respectivement. Chez les hommes fertiles et infertiles, il y avait gamme de niveaux de malondialdéhyde (MDA) dans le plasma séminal, la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx) L'analyse des données a été effectuée à l'aide de SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, corrélations négatives</li> </ul>

		<p>significatives entre la fragmentation de l'ADN du sperme et la concentration, la motilité et la morphologie normale des spermatozoïdes. Les activités SOD et GPx dans le plasma séminal ont montré des résultats positifs significatifs.</p> <p>La fragmentation de l'ADN du sperme a montré une corrélation positive significative avec les niveaux de MDA dans le plasma séminal et corrélations négatives significatives avec les activités SOD et GPx dans le plasma séminal dans les deux groupes.</p> <p>Une valeur diagnostique pour l'indice MDA a été relevé par une analyse ROC en ce qui concerne l'infertilité masculine, avec une ASC de niveau de dommages à l'ADN et d : niveau élevé de 0,762 (intervalle de confiance à 95% = 0,700–0,817), sensibilité = 44,64% et spécificité = 97,14 % avec une valeur seuil de 4,2 nmol/ml.</p> <p>Une valeur diagnostique pour l'activité SOD a été relevé en ce qui concerne l'infertilité masculine, avec une ASC de 0,874 (confiance à 95% intervalle = 0,822–0,915), sensibilité = 69,64 % et spécificité = 93,33 % avec une valeur seuil de 4,89 U/m.</p> <p>L'activité GPx a montré paramètres chez les hommes fertiles et infertiles (b)une valeur diagnostique concernant l'infertilité masculine avec une ASC de 0,969 (95% intervalle de confiance = 0,936–0,987), sensibilité = 92,86 % et spécificité = 98,10 % avec une valeur seuil de 329,6 mU/ml.</p>
<p><b>4- Analyse de la fragmentation de l'ADN, de la translocation de la phosphatidylsérine dans la membrane plasmique et du stress oxydatif dans les spermatozoïdes humains</b></p>	<p>Gerardo Barroso, Mahmood Morshedi et Sergio Oehninger.</p>	<p>Les caractéristiques des éjaculations originales des hommes stériles analysés étaient les suivantes : concentration des spermatozoïdes, plage de 13 à 271 10 /ml (moyenne : 108 70), motilité progressive, plage de 23 à 97 % (moyenne : 67 25), et morphologie normale, plage de 2 à 15 % (moyenne : 10 4).</p> <p>La motilité progressive et la motilité hyperactivée étaient significativement plus élevées dans la couche à 95 %.</p>

		<p>Inversement, la génération de ROS était significativement plus élevée dans les fractions à faible motilité des spermatozoïdes. (17,12% et 11,5% respectivement, <math>P &gt; 0,5</math>).</p> <p>Dans les fractions où la motilité des spermatozoïdes était élevée, la gamme de cellules positives à l'annexine V était de 4 à 42 % ; cette gamme était de 1 à 17 % dans les fractions où la motilité des spermatozoïdes était faible.</p> <p>La proportion de cellules diagnostiquées comme nécrotiques (PI positif) était significativement plus élevée dans les fractions ayant une faible motilité des spermatozoïdes (valeur moyenne de 70,8 % contre 72 % dans les fractions ayant une forte motilité des spermatozoïdes, <math>P = 0,002</math>).</p> <p>La proportion de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN (telle que représentée par TUNEL) et avec l'ADN monocaténaire (tel que détecté avec la mAB) était significativement plus élevée dans les fractions avec faible motilité des spermatozoïdes.</p> <p>Pour TUNEL, la gamme (et la moyenne) des spermatozoïdes ayant des dommages à l'ADN étaient de 0 à 3 % (1,1) et de 4 à 25 % (11,7) pour les fractions ayant une motilité élevée et faible des spermatozoïdes, respectivement (<math>P &lt; 0,05</math>).</p> <p>Pour les mAB, ces valeurs étaient de 0 à 7 % (3,3) et de 4 à 17 % (10,6) pour les fractions ayant une motilité élevée et faible des spermatozoïdes, respectivement (<math>P &lt; 0,05</math>).</p> <p>Il y avait une corrélation positive significative entre les techniques TUNEL et mAB (<math>r = 0,78</math>, <math>P = 0,03</math>). La génération de ROS présentait une corrélation positive significative avec la présence de dommages à l'ADN (<math>r = 0,42</math>, <math>P = 0,02</math>).</p>
<p>5- Intérêt de l'étude de l'oxydation de l'ADN des</p>	<p>Nozha CHAKROUN FEKI, Nassira ZRIBI,</p>	<p>• Les valeurs moyennes des paramètres spermatiques :</p>

<p><b>spermatozoïdes par marquage de la 8-oxo-guanine en cryométrie en flux chez l'homme infertile</b></p>	<p>Henda ELEUCH, Radouane GDOURA, Afifa SELLAMI, Ali BAHLOUL, Adnene HAMMAMI, Jalel GAR GOURI, Tarek REBAI, Leila KESKESAMMAR</p>	<p>L'âge moyen des patients était de 38 ans avec une durée moyenne d'infertilité de 4 ans.</p> <p>L'abstinence sexuelle était de 3 jours en moyenne (3-5 jours).</p> <p>Le volume moyen des éjaculats était de 3,5 ml avec un pH moyen de 7,8.</p> <p>Le taux moyen de PNN dans le sperme était de 300 000/ml, un seul patient était leucospermique selon le critère de l'OMS</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cryométrie en flux et oxydation de l'ADN :</li> </ul> <p>Dans la population des hommes infertiles étudiée, le taux de spermatozoïdes à ADN oxydé était en moyenne de 13%.</p> <p>Plus des deux tiers des patients (70%) présentaient un taux supérieur à 10% de spermatozoïde à ADN oxydé.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxydation de l'ADN et paramètres spermatiques :</li> </ul> <p>Absence d'association entre l'oxydation de l'ADN et les paramètres spermatiques.</p> <p>Une corrélation positive très significative entre le taux de leucocytes dans le sperme et l'oxydation de l'ADN spermatique (<math>p=0,006</math>), ceci après ajustement aux autres paramètres spermatiques : mobilité, vitalité, morphologie et numération des spermatozoïdes des et des cellules rondes.</p> <p>La comparaison des moyennes du taux des PNN et de l'oxydation de l'ADN entre les groupes 1 et 2 a montré des différences significatives (respectivement <math>p=0,002</math> et <math>p=0,03</math>).</p> <p>La comparaison des moyennes du taux des PNN et de l'oxydation de l'ADN entre les groupes 1 et 2 a montré des différences significatives (respectivement <math>p=0,002</math> et <math>p=0,03</math>).</p>
<p><b>6- Leucospermie, stress oxydatif et fertilité masculine : certitudes et hypothèses</b></p>	<p>T. Lemkecher, S. D'Artigues, J. Vaysse b , O. Kulski, V. Barraud-</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mesure du Leucospermie :</li> </ul> <p>La valeur de la leucospermie obtenue par l'analyse de la cytologie n'est pas corrélée à celle obtenue par le Leucoscreen.</p>

	<p>Lange, L. Gattegno , J.-P. Wolf</p>	<p>La valeur de la cytologie et celle du Leucoscreen sont toutes deux corrélées à celle du cytomètre de flux de façon significative (<math>p &lt; 0,01</math>). La corrélation est plus forte entre la valeur de la cytométrie de flux et celle du Leucoscreen (<math>r = 0,7</math>) qu'avec celle de la cytologie (<math>r = 0,5</math>). Les valeurs chez les hommes fertiles allaient de 8970 à 20 millions de leucocytes par éjaculat et de 43 120 à 104 millions chez les infertiles, significativement différentes. Les moyennes et les médianes des granulocytes, monocytes/macrophages et des lymphocytes étaient aussi plus élevés chez les patients infertiles.</p>
<p><b>7- Le stress oxydatif induit des dommages à l'ADN des spermatozoïdes, a raison possible de l'infertilité masculine</b></p>	<p>Md Bayejid Hosen<sup>1</sup> M.Sc, Md Rakibul Islam<sup>1</sup> Ph.D., Firoza Begum M.D., Yearul Kabir<sup>1</sup> Ph.D., M Zakir Hossain Howlader Ph.D.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualité du sperme chez les sujets de l'étude : Le nombre de spermatozoïdes chez les hommes fertiles était significativement plus élevé (<math>p &lt; 0,001</math>) que l'infertiles. les pourcentages de motile et les cellules morphologiquement normales étaient significativement plus élevées (<math>p &lt; 0,001</math>) chez les hommes fertiles que chez les hommes infertiles.</li> <li>• État oxydatif et dommages à l'ADN chez les sujets de l'étude : Les concentrations séminales de malondialdéhyde et d'hydroperoxyde phospholipidique étaient significatives plus élevé (dans les deux cas <math>p &lt; 0,001</math>) chez les hommes stériles que chez les hommes fertiles. L'activité du superoxyde dismutase séminale et les niveaux de statut antioxydant total étaient significativement plus élevés (<math>p &lt; 0,001</math>) chez les hommes fertiles que chez les hommes stériles. Les niveaux séminaux de 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine chez les hommes fertiles étaient significativement plus faible (<math>p &lt; 0,001</math>) que chez les hommes stériles.</li> <li>• Corrélation de différents paramètres entre les hommes stériles :</li> </ul>

		<p>Une corrélation négative de la motilité des spermatozoïdes avec MDA, PHP et 8-OHdG alors qu'il y avait une corrélation positive de la motilité des spermatozoïdes avec SOD et TAS.</p> <p>Une corrélation positive entre la motilité des spermatozoïdes et le nombre de spermatozoïdes, mais qui n'était pas statistiquement significative, ce qui indique que la motilité des spermatozoïdes ne dépend pas du nombre de spermatozoïdes.</p> <p>Une corrélation négative a été constatée entre le nombre de spermatozoïdes avec MDA, PHP et 8-OHdG, une corrélation positive avec SOD, TAS et morphologie a été observée.</p> <p>La morphologie a été corrélée négativement avec MDA, PHP et 8-OHdG tandis que la DOE a été positivement corrélée et il y avait une corrélation positive insignifiante avec la TAS et la motilité.</p> <p>La corrélation positive du 8-OHdG avec le MDA et le PHP indiquant des dommages oxydatifs à l'ADN, tandis que la corrélation négative avec le SOD et le TAS.</p>
<p><b>8- Stress oxydatif éjaculat est lié à la fragmentation de l'ADN du sperme et des cellules rondes</b></p>	<p>Valeria Maria Iommiello, Elena Albani, Alessandra Di Rosa, Alessandra Marras, Francesca Menduni, Giovanna Morreale, Shanti Lia Levi, Benedetta Pisano, and Paolo Emanuele Levi-Sett</p>	<p>Les paramètres évalués dans l'analyse séminale comprenaient la concentration des spermatozoïdes (<math>P = 0,2297</math>), la motilité des spermatozoïdes (<math>P = 0,9462</math>), la viabilité des spermatozoïdes (<math>P = 0,7312</math>) et le pourcentage de formes de spermatozoïdes normales (<math>P = 0,5513</math>).</p> <p>IFD plus élevée et statistiquement plus significative (IFD 30 %) dans le groupe HOS par rapport au groupe LOS (<math>P = 0,0379</math>) suggérant que le déséquilibre de l'anion superoxyde est lié à la fragmentation de l'ADN du sperme.</p> <p>Médiane IF de 21,58 % (6,84 à 64,44), tandis que le groupe LOS a une médiane IFD de 16,345 % (4,99 à 45,07)</p> <p>Une relation statistiquement significative entre l'IFD et le niveau OS avec une valeur</p>



		<p>de coefficient de corrélation de 3,76 (IC à 95 % : 0,52, 6,99).</p> <p>Un niveaux élevés de SG en présence de concentration élevée de ce type de cellules suggérant une forte corrélation entre la concentration des cellules rondes &gt;1,5 10<sup>6</sup>/mL dans le sperme et les niveaux élevés d'OS (P = 0,0084); cela appuie la connaissance que les ROS dans l'éjaculat humain proviennent principalement de leucocytes.</p> <p>La concentration médiane de cellules rondes dans le groupe de sperme HOS est de 0,8 10<sup>6</sup>/mL (0,1 à 3,3) par opposition à 0,3 10<sup>6</sup>/mL (0,1 à 2,5) dans le groupe LOS.</p>
<p><b>9- Spermatozoïdes induits par la codéine appose</b></p>	<p>Ayodeji Folorunso Ajayi et Roland Eghoghoosa Akhigbe</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'effet de la codéine sur l'équilibre oxydatif dans les spermatozoïdes : Le traitement à la codéine a entraîné une concentration et une activité significativement plus élevées de MDA et de MPO respectivement dans les spermatozoïdes (p &lt; 0,05). Chez les lapins traités à la codéine des activités significativement plus faibles de SOD et de GPx en fonction de la dose (p &lt; 0,05).</li> <li>• L'effet de la codéine sur les taux de testostérone dans le sérum et les testicules : Le traitement à la codéine a entraîné une suppression importante des taux de testostérone dans la circulation et dans les testicules (p &lt; 0,05). La baisse de la concentration d'androgènes était liée à la dose (p &lt; 0,05).</li> <li>• L'effet du traitement à la codéine sur l'intégrité de la membrane plasmatique des spermatozoïdes au moyen du test d'enflure hypoosmotique (HOST) : À 4 mg/kg b.w, la codéine a entraîné une baisse de 25 % et de 30 % de l'intégrité de la membrane plasmatique des spermatozoïdes dans 30 et 60 min, respectivement. À 10 mg/kg b.w, cette</li> </ul>

molécule a causé un déclin de 35 % et 42 % de l'intégrité de la membrane plasmique du sperme. en 30 et 60 minutes respectivement. La mauvaise intégrité de la membrane observée dans les traitements à la codéine était proportionnelle à la dose et significative par rapport au témoin ( $p < 0,05$ ).

- Fragmentation de l'ADN du sperme, dommages oxydatifs de l'ADN et appose :

L'indice de fragmentation de l'ADN du sperme (IFD) était significativement plus élevé chez les animaux traités à la codéine. Le traitement à faible dose de codéine a entraîné une augmentation de 56 % de l'IFD des spermatozoïdes, tandis que la codéine à forte dose a entraîné une augmentation de 67 %.

De même, des niveaux significativement plus élevés de 8-hydroxy-2-désoxyactivité de -la guanosine et de la caspase 3 par rapport aux groupes témoins

La codéine à faible dose et à forte dose a mené à 35 % et 54 % niveaux plus élevés de 8OHdG, respectivement, et de 58% et 71% plus élevés de caspase 3 activités, respectivement.

- Relation entre la qualité du sperme, la fragmentation de l'ADN du sperme, 8OHdG et caspase 3 activity :

8OHdG a été corrélé négativement avec la concentration des spermatozoïdes ( $r = 0,904$ ;  $p < 0,001$ ), la motilité des spermatozoïdes ( $r = 0,934$ ;  $p < 0,001$ ), la viabilité des spermatozoïdes ( $r = 0,935$ ;  $p < 0,001$ ), le pourcentage de spermatozoïdes normaux ( $r = 0,961$ ;  $p < 0,001$ ), l'HÔTE à 30 min ( $r = 0,938$ ;  $p < 0,001$ ) et l'HÔTE à 60 min ( $r = 0,942$ ;  $p < 0,001$ ), et en corrélation positive avec la fragmentation de l'ADN du sperme ( $r = 0,974$ ;  $p < 0,001$ ). L'activité de la caspase 3 était corrélée négativement avec la concentration des spermatozoïdes ( $r = 0,836$ ;  $p < 0,001$ ), la motilité des spermatozoïdes ( $r = 0,853$ ;  $p <$

		<p>0,001), la viabilité des spermatozoïdes (<math>r = 0,857</math>; <math>p &lt; 0,001</math>), le pourcentage de spermatozoïdes normaux (<math>r = 0,872</math>; <math>p &lt; 0,001</math>), l'HÔTE à 30 min (<math>r = 0,879</math>; <math>p &lt; 0,001</math>). et HOST à 60 min (<math>r = 0,894</math>; <math>p &lt; 0,001</math>), et positivement corrélé avec la fragmentation de l'ADN du sperme (<math>r = 0,903</math>; <math>p &lt; 0,001</math>).</p> <p>Les corrélations étaient significatives (<math>p = 0,000</math>), elles étaient plus élevées entre l'O8HdG et la qualité des spermatozoïdes qu'entre l'activité caspase 3 et la qualité des spermatozoïdes.</p> <p>Les dommages causés à l'ADN des spermatozoïdes, évalués par les spermatozoïdes 8OHdG, étaient davantage associés à la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes induite par la codéine (z-score = 0,835; <math>p = 0,000</math>) qu'à l'apoptose des spermatozoïdes (z-score = 0,156; <math>p = 0,187</math>).</p>
<p><b>10- Valeur prédictive des tests de stress oxydatif dans le sperme pour la fragmentation de l'ADN du sperme évaluée par le test de dispersion de la chromatine du sperme</b></p>	<p>Haitham Elbardisi, Renata Finelli, Ashok Agrawal, Ahmad Majzoub RalfHenkel, Mohamed Arafa,</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Corrélations statistiques entre la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et l'ORP :</li> </ul> <p>Dans l'ensemble, la FDS a une corrélation positive significative avec l'ORP séminal normalisé pour la concentration des spermatozoïdes (<math>r = .218</math>, <math>P &lt; .0001</math>) ainsi qu'avec l'ORP normalisée pour la concentration de spermatozoïdes mobiles (motORP) (<math>r = .387</math>, <math>P &lt; .0001</math>).</p> <p>La corrélation du SDF avec mot ORP était significativement (<math>P &lt; 0,0001</math>) plus forte que pour l'ORP normalisée pour la concentration de spermatozoïdes. ORP normalisé au nombre de spermatozoïdes et mot-ORP était fortement et positivement corrélé (<math>r = .917</math>, <math>P &lt; .0001</math>).</p> <p>Un FDS élevé ont montré des valeurs ORP significativement plus élevées (<math>P &lt; 0,0001</math>) (moyenne : 4,1 mV/10<sup>6</sup> spermatozoïdes/mL) que les patients ayant un FDS faible (moyenne : 2,5 mV/10<sup>6</sup> spermatozoïdes/mL).</p> <p>Lorsque le SDF a été analysé dans les sous-groupes ORP (High/Low), les</p>

		<p>patients avec des valeurs ORP faibles ont montré significativement (<math>P &lt; .0001</math>) plus faible (moyenne : 25,1 %) SDF que les patients avec ORP élevé (moyenne : 30,9 %)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Analyse du ROC : <ul style="list-style-type: none"> <li>. Bien que la zone sous la courbe (SSC) de 0,623 ne soit pas très élevée et se situe relativement près de la ligne de supposition aléatoire, un ORP égal à 1,77 mV/106 spermatozoïdes/mL peut significativement (<math>P &lt; 0,0001</math>) prédire un FDS élevé avec une spécificité de 56,3 %, une sensibilité de 63,5 %, une valeur prédictive positive (VAP) de 37,3 % et une valeur prédictive négative (VAN) de 79,1 %. Une deuxième courbe ROC a été générée en considérant le motORP pour prédire le taux de SDF. Dans ce cas.</li> <li>Une valeur seuil de 4,96 mV/106 spermatozoïdes mobiles/mL a montré une meilleure prédiction du FDS que l'ORP (ASC : 0,719) avec une spécificité de 71,5 %, une sensibilité de 61,9 %, une VAP de 47,1 % et une VAN de 82,1 %. Une différence significative entre les deux courbes a été observée (<math>P &lt; 0,0001</math>).</li> <li>La puissance de l'ORP et du motORP dans la prédiction de l'état de normozoospermia a été évaluée. Lorsque l'ORP a été utilisé, la courbe ROC a montré une SSC de 0,771, avec une sensibilité de 57,33 %, une spécificité de 78,6 %, une VAP de 16,8 % et une VAN de 96,1 %. La courbe ROC générée pour motORP a montré, avec une SSC de 0,826, une meilleure puissance de prédiction (<math>P &lt; 0,0001</math>) avec une sensibilité de 82,7 % et une spécificité de 68,5 %, ainsi qu'une VAP de 16,5 % et une VAN de 98,1 %.</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>11- Une comparaison entre deux tests pour mesurer le stress oxydatif séminal et leur relation avec la fragmentation de l'ADN</b></p>	<p>Sheryl T. Homa, Anna M. Vassiliou, Jesse Stone,</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Corrélation entre la SG et les dommages à l'ADN du sperme ; comparaison entre deux méthodes de mesure de la SG : Cette étude a examiné s'il existe une corrélation directe entre le stress oxydatif</li> </ul>

<p><b>du sperme et les paramètres du sperme</b></p>	<p>Aideen P. Killeen, Andrew Dawkins,  Jingyi Xie,  Farley Gould,  Jonathan W. A. Ramsay</p>	<p>et les dommages à l'ADN et si les observations sont cohérentes entre les deux méthodes de mesure du stress oxydatif. Des observations ont été faites avec et sans l'inclusion d'échantillons atteints de leucocytospermie, car ils sont connus pour produire des niveaux élevés de ROS exogènes et peuvent obscurcir les effets des ROS générés de manière endogène. Premièrement, il fallait voir si la détection des ROS était égale entre les deux méthodes d'évaluation. Le stress oxydatif a été évalué dans 315 échantillons en utilisant soit le test de chimiluminescence, soit le test du potentiel d'oxydoréduction. Les résultats ont montré qu'il y avait une corrélation positive faible mais toujours significative entre les observations de ROS et de sORP (<math>R^2 = 0,1172</math>, <math>p = 0,0376</math>, <math>n = 315</math>).</p> <p>De manière intéressante, en excluant l'échantillon de spermatose leucocytaire, la corrélation entre sORP et ROS est légèrement plus forte (<math>R^2 = 0,15095</math>, <math>p = 0,0089</math>, <math>n = 299</math>). Lorsque les niveaux de sORP et d'IFD ont été comparés, les ROS étaient fortement corrélés à l'IFD, montrant une relation positive modérée (<math>R^2 = 0,24316</math>, <math>p = 0,0002</math>, <math>n = 237</math>). L'ORP montre une association similaire avec DFI, mais elle n'est pas significative et peut être associée à un nombre relativement faible d'échantillons (<math>R^2 = 0,23992</math>, <math>p = 0,1043</math>, <math>n = 47</math>).</p> <p>En l'absence de données provenant de patients avec un PMN élevé, la corrélation entre les ROS et les DFI était également légèrement plus forte (<math>R^2 = 0,31139</math>, <math>p &lt; 0,0001</math>, <math>n = 222</math>), mais pas pour le sORP. Cela est probablement dû au fait qu'un seul patient du groupe sORP avait une spermatose leucocytaire (<math>R^2 = 0,22706</math>, <math>p = 0,1291</math>, <math>n = 46</math>).</p> <p>En revanche, HDS ne montre pas de corrélation significative avec le stress oxydatif, quelle que soit la</p>
---	--	---

leucocytospermie, quelle que soit la leucocytospermie ( $R^2 = 0,11211$ ,  $p = 0,085$ ,  $n = 237$ ) ou sORP ( $R^2 = 0,01222$ ,  $p = 0,9351$ ,  $n = 47$ ). hors PMN : ROS  $R^2 = 0,10329$ ,  $p = 0,1249$ ,  $n = 222$ , sORP  $R^2 = 0,01853$ ,  $p = 0,9027$ ,  $n = 46$ ). Dommages à l'ADN et niveaux de HDS dans des échantillons de sperme équilibrés par rapport à des échantillons soumis à un stress oxydatif.

Les tests de chimiluminescence et MiOXSYS ont été validés et vérifiés par Doctors Laboratory, qui est accrédité ISO15189 UKAS. Les plages de référence déterminées par l'analyse ROC étaient ROS  $\leq 13,8$  RLU/sec/106 spermatozoïdes/mL (sensibilité 86 % ; spécificité 86 %), sORP  $\leq 1,4$  mV/106 spermatozoïdes/mL (sensibilité 76,4 % ; spécificité 86 %) 75,9 %).

Les échantillons qui dépassent les valeurs cliniques de référence sont considérés comme étant sous stress oxydatif. Lorsque la cohorte de patients est divisée en groupes avec ou sans stress oxydatif, le DFI moyen est significativement plus élevé dans le groupe OS quelle que soit la méthode de mesure de la OS utilisée, bien que la différence soit beaucoup plus significative lorsque la OS est mesurée par le potentiel redox avec les PMN exclus le DFI dans le groupe avec OS tel que mesuré par ROS est légèrement plus élevé ( $24,67 \pm 1,78$  contre  $22,86 \pm 1,59$ ), mais cette différence n'était pas significative.

- Corrélation entre le stress oxydatif, les lésions de l'ADN du sperme et les paramètres du sperme :

Le stress oxydatif se manifeste par une mauvaise qualité du sperme. En utilisant les deux méthodes différentes de mesure de l'OS, les résultats démontrent une corrélation négative hautement significative entre l'OS et la motilité totale, la motilité progressive, le nombre total de

spermatozoïdes mobiles, la vitalité et la morphologie.

La corrélation est environ 2 fois plus forte lorsque la SG est mesurée par sORP que par ROS pour tous les paramètres, à l'exception des biotiques qui montrent une association plus forte et plus significative avec les ROS (sORP :  $R^2 = -0,13519$ ,  $p = 0,019$  ; ROS :  $R^2 = -0,20832$ ,  $p < 0,0001$ ). Cela suggère que les mesures de sORP pourraient être des marqueurs plus sensibles du stress oxydatif que les ROS. Des corrélations négatives encore plus fortes et très significatives sont observées entre l'IFD et les paramètres du sperme, en particulier pour la motilité totale ( $R^2 = -0,53951$ ,  $p < 0,0001$ ) et la motilité progressive ( $R^2 = -0,48693$ ),  $p < 0,0001$ ) et vitalité ( $R^2 = -0,5727$ ,  $p < 0,0001$ ).

En revanche, les niveaux de HDS ne sont pas systématiquement corrélés avec la vitalité, mais sont négativement corrélés avec tous les autres paramètres du sperme. La corrélation la plus forte est entre HDS et morphologie et est hautement significative ( $R^2 = -0,48848$ ,  $p = 0 < 0,0001$ ). L'ORP est corrélé négativement avec la morphologie ( $R^2 = -0,22642$ ,  $p < 0,0001$ ), bien que la corrélation ne soit pas aussi forte qu'entre l'HDS et la morphologie.

Les leucocytes polymorphes sont connus pour produire des niveaux élevés de ROS, mais la présence de PMN dans le liquide séminal n'est pas corrélée avec les marqueurs classiques des dommages oxydatifs aux spermatozoïdes, y compris la motilité, la viabilité et les dommages des spermatozoïdes. L'ADN a une forte corrélation positive avec le nombre de spermatozoïdes.

- Comparaison des dommages à l'ADN des spermatozoïdes et de la durée de vie parmi différents groupes de patients sélectionnés en fonction des paramètres du sperme :

Pour évaluer la corrélation entre les ROS, les dommages à l'ADN et les paramètres du sperme, les patients ont été regroupés selon qu'ils avaient des paramètres de sperme normaux ou anormaux. Étant donné que les PMN sont bien connus pour générer des niveaux élevés de ROS, les échantillons contenant  $\geq 1 \times 10^6$  millions/ml de PMN ont été regroupés dans une catégorie distincte. Les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène, sORP, DFI et HDS ont été analysés entre différents groupes de patients.

Les niveaux de SO sont significativement plus élevés dans les échantillons de sperme avec un ou plusieurs paramètres de sperme anormaux que dans les échantillons avec des paramètres de sperme normaux, comme prévu, quelle que soit la méthode de mesure de la SG (ROS :  $p < 0,001$  ; b sORP :  $p < 0,007$ ).

Les valeurs moyennes de ROS sont de 0,80 (gamme 0-319,6) pour les échantillons de sperme normaux contre 2,95 (gamme 0-1755) pour les échantillons anormaux, tandis que la valeur moyenne de sORP est de 0,44 (gamme -0,18- 18,16) pour les échantillons normaux contre 1. Pour les échantillons anormaux, la plage est de -0,78 à 59,43.

Les niveaux de ROS sont plus élevés dans le groupe d'hommes atteints de mononucléose dans le sperme et sont significativement plus élevés que chez les hommes ayant des paramètres spermatiques normaux (PMN : moyenne 71,3, plage 0, 9-957,2 vs normale : 0,8, plage 0-319,6) ( $p < 0,0001$ ).

De manière inattendue, contrairement aux résultats observés avec les mesures de ROS, les niveaux de sORP n'étaient pas significativement différents entre le groupe avec des paramètres spermatiques normaux et le groupe avec PMN (sORP normal : médiane). Valeur 0,44, plage-0,



		<p>18-18,16 vs PMN : médiane 0,40, plage 0,06-1,49).</p> <p>Différences dans les dommages à l'ADN du sperme entre les groupes de patients. Les échantillons avec des paramètres de sperme anormaux, tels que sORP, ont un DFI médian significativement plus élevé par rapport aux échantillons avec des paramètres normaux, mais des leucocytes. Le DFI médian pour les échantillons de maladies du sperme correspond aux paramètres normaux du sperme.</p>
<p><b>12- L'utilisation d'ordinateurs portables connectés à Internet via Wi-Fi diminue la motilité du sperme humain et augmente la fragmentation de l'ADN du sperme</b></p>	<p>Conrado Avendano, M.S., Ariela Mata, M.S., Cesar A. Sanchez Sarmiento, M.D, and Gustavo F. Doncel, M.D., 108</p>	<p>L'âge moyen des donneurs était de 34,1 5,6 ans (de 26 à 45 ans). De nombreux échantillons ont montré une normozoospermie, tandis que quatre échantillons ont montré un faible volume de sperme (LS6, LS13, LS27 et LS29) et trois (LS15, LS16 et LS25) ont présenté une térazoospermie isolée, selon les valeurs de référence de l'Organisation mondiale de la Santé.</p> <p>La température de la pièce et de l'ordinateur portable a été surveillée pendant l'incubation et maintenue à 25 °C pour les deux fractions de sperme (A et B) par un système de climatisation.</p> <p>Les RF-EMW ont été enregistrés toutes les 10 minutes dans les deux groupes tout au long de l'expérience. Le RF-EMW d'un ordinateur portable fonctionnant sans connexion Wi-Fi a été vérifié dans une expérience pilote.</p> <p>Le rayonnement provenant de l'ordinateur fonctionnant avec le Wi-Fi était trois fois ou plus élevé que sans le Wi-Fi et de 7 à 15 fois plus élevé que les conditions basales (non exposé à un ordinateur portable). Les paramètres des spermatozoïdes ont été évalués après 4 heures d'incubation de</p>

		<p>spermatozoïdes mobiles sélectionnés à la nage et exposés à un ordinateur portable actif dans des conditions de température contrôlée. Il n'y avait aucune différence dans le pourcentage de spermatozoïdes viables entre le groupe expérimental et le groupe témoin.</p> <p>L'exposition des ordinateurs portables a induit une diminution significative de la motilité progressive des spermatozoïdes avec une augmentation concomitante des spermatozoïdes non mobiles par rapport aux témoins non exposés (<math>P &lt; 0,05</math>).</p> <p>Le pourcentage de spermatozoïdes non progressifs n'a pas montré de différences statistiquement significatives. Important, une augmentation significative de la fragmentation de l'ADN du sperme a été trouvée dans la fraction incubé sous ordinateur par rapport au groupe témoin (3.3, 6.0 vs. 8.3, 6.6; <math>P &lt; 0,05</math>).</p>
<p><b>13- La relation entre la fragmentation de l'ADN du sperme, les radicaux libres et capacité antioxydante avec perte de grossesse répétée idiopathique</b></p>	<p>Narges Kamkar , Fariba Ramezani , Marjan Sabbaghian</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La comparaison des paramètres du sperme dans les groupes LRP et témoins :</li> </ul> <p>La motilité des spermatozoïdes chez les patients était significativement inférieure à celle du groupe témoin (<math>P = 0,001</math>).</p> <p>Le nombre de spermatozoïdes et la morphologie n'étaient pas significativement différents entre les deux groupes étudiés.</p> <p>La population de spermatozoïdes, représentant l'ADN endommagé, était plus élevée chez les patients atteints de LRP que chez les témoins.</p> <p>Le pourcentage moyen de spermatozoïdes présentant des dommages à l'ADN chez les patients et les groupes témoins était de 25,95 10,20 et 19,44 7,62, respectivement.</p>

		<p>Les spermatozoïdes vert vif du groupe expérimental étaient plus élevés que ceux du groupe témoin.</p> <p>Le pourcentage de défaut d'ADN du sperme mesuré dans l'étude et le groupe témoin était de 14,49 6,09 et 9,65 3,66 respectivement.</p> <p>L'évaluation des espèces réactives d'oxygène et la capacité antioxydante totale étaient de 84,85 23,92 et de 2,69 0,88 dans le groupe RPL, comparativement à 12,26 6,22 nm et 3,63 1,31 nm dans les groupes témoins, respectivement.</p> <p>Une augmentation de l'IFD, ROS (P &lt; 0,001).</p> <p>Le pourcentage de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et la quantité de radicaux libres dans le groupe LRP étaient significativement plus élevés que dans le groupe témoin (P &lt; 0,001).</p> <p>Comparativement au groupe témoin, les conjoints d'hommes qui avaient une faible motilité des spermatozoïdes et une plus grande fragmentation de l'ADN avait un risque plus élevé de fausse couche spontanée.</p>
<p><b>14-Microdélétions chromosomiques Y, fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et stress oxydatif des spermatozoïdes comme causes d'avortement spontané récurrent d'étiologie inconnue</b></p>	<p>J. Bellver , M. Meseguer , L. Muriel , S. Garcí'a-Herrero, M.A.M. Barreto, A.L. Garda , J. Remohí', A. Pellicer , and N. Garrido</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Démographie : L'âge était significativement plus faible chez les hommes de sexe masculin (de 20 à 34 ans) que chez les hommes des groupes SO (de 26 à 44 ans) et RSA (de 30 à 42 ans). La qualité des spermatozoïdes était également significativement plus élevée dans le premier groupe, où les valeurs de concentration des spermatozoïdes (allant de 29 à 250 millions/ml), de motilité des spermatozoïdes (allant de 29 à 67 % des formes A + B) et du nombre total de spermatozoïdes mobiles (allant de 80 à 278 millions) étaient supérieures, en particulier par rapport au groupe sélectionné de SO (allant de 0,3 à 5 millions/ml de concentration de spermatozoïdes, de 0,09 à 7,42 millions de spermatozoïdes mobiles et de 3 à 53 % sous forme A + B).</li> </ul>

Lorsqu'ils ont comparé la qualité des spermatozoïdes mâles à celle du groupe RSA (concentration variant de 11 à 110 millions/ml), une différence significative dans la concentration des spermatozoïdes a été observé, mais pas dans d'autres paramètres.

Dans les deux SD et RSA, la concentration des spermatozoïdes était toujours normale (0,20 million/ml).

Les pourcentages de fumeurs étaient statistiquement comparables dans les trois groupes, tant chez les hommes que chez les femmes, ce qui excluait toute influence confusionnelle de ce paramètre sur les résultats.

Néanmoins, une tendance à une baisse du nombre moyen de cigarettes fumées par jour a été observée dans le groupe SD (allant de 0 à 3 cigarettes/jour) par rapport aux groupes SO (allant de 0 à 20 cigarettes/jour) et RSA (allant de 0 à 30 cigarettes/jour). Le nombre moyen et l'âge moyen des fausses couches.

Le nombre de pertes de grossesse parmi les couples du groupe RSA variaient de 3 à 7, tandis que la semaine gestationnelle moyenne au cours de laquelle la grossesse a été perdue variait de 5 à 14.

- Contribution génétique de l'homme à la RSA :

Ils n'ont pu trouver de microdélétions du chromosome Y chez aucun des mâles inclus dans les groupes SD, SO ou RSA. En ce qui concerne la qualité de l'ADN des spermatozoïdes, deux paramètres ont été évalués : la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et l'oxydation de l'ADN des spermatozoïdes. En résumé, le nombre moyen de spermatozoïdes à ADN fragmenté était de 24,06 % (IC à 95 % 20,87 à 27,23) dans le groupe SD, comparativement à 46,01 % (IC à 95 % 40,40 à 51,62) dans le groupe SO et à 33,48 % (IC à 95 % 28,24 à 38,72). Dans le groupe RSA, avec des différences

statistiquement significatives entre le SD et le RSA et entre les groupes SD et SO.

Les résultats de l'analyse de l'oxydation de l'ADN des spermatozoïdes dans les trois groupes étaient comparables en termes de pourcentage de cellules oxydées, avec des valeurs de 32,14 % (IC à 95 % de 24,62 à 39,65) dans le groupe SD, 24,01 % (IC à 95 % de 16,85 à 31,17) dans le groupe SO et 32,43 % (IC à 95 % de 24,62 à 40,24) dans le groupe RSA. Lorsque l'on a comparé l'intensité de coloration de l'oxydation de l'ADN, l'oxydation moyenne de l'ADN des spermatozoïdes était de 87,25 (IC à 95 % 61,16–113,34) unités de fluorescence relative (UDF) dans le groupe SD, de 87,58 UDF (IC à 95 % 63,69–111,48) dans le groupe SO et de 68,04 UDF (IC à 95 % 53,55–82,53) dans le groupe RSA.

Les différences entre les groupes n'étaient pas significatives.

La valeur prédictive de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et de l'oxydation de l'ADN pour prévoir les fausses couches récurrentes.

Les faibles valeurs des zones sous la courbe indiquent l'absence d'un pouvoir prédictif de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes ou d'analyse de l'oxydation dans les spermatozoïdes par rapport à la RSA, la capacité des mesures de fragmentation et d'oxydation de l'ADN de distinguer les mâles des couples avec ou sans fausses couches récurrentes.

Seul le pourcentage de cellules oxydées présentait une faible capacité à prédire adéquatement l'occurrence de la RSA, bien qu'il n'ait pas été suffisant pour qu'il soit appliqué comme outil de diagnostic (où une zone optimale sous la courbe devrait être 0,8).

<p><b>15- Développement de l'essai NBT comme marqueur du stress spermoxidatif</b></p>	<p>Ozlem Tunc, Jeremy Thompson, Kelton Tremellen</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relation entre la production de ROS et les mesures de la santé des spermatozoïdes :  La production moyenne de formazan par les mâles infertiles était considérablement plus élevée que celle observée pour leurs homologues fertiles (72,6 58,5lg 107spermatozoïdes c. 17,8 12,6lg 107spermatozoïdes, <math>p &lt; 0,0001</math>).  Une très forte corrélation entre l'amorce de l'apoptose) et l'accroissement de la production de ROS séminales (<math>r = 0,669, p &lt; 0,0001</math>).  Une augmentation significative de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes avec des niveaux croissants de production de ROS (<math>r = 0,591, p &lt; 0,0001</math>).  Une corrélation négative existe entre la formazan production et la motilité des spermatozoïdes (<math>r = -0,479, p = 0,002</math>), ce qui suggère que la production de ROS par les spermatozoïdes et séminales.  Aucune corrélation significative n'a été observée entre l'élastase plasmatique séminale et la production de formazan (<math>r = 0,006, p = 0,965</math>).  Seulement 4 participants sur 36 (11 %) présentaient des signes d'activité leucocytaire élevée (élastase PMN <math>&gt; 290</math> ng mL), ce qui pourrait limiter la capacité de cette étude à corréler l'activité leucocytaire séminale avec la production de formazan.</li> <li>• Développement de plages normales  Deux déterminants clés de l'utilité clinique de l'essai NBT peuvent être déterminées. Premièrement, le point de coupure optimal pour maximiser la sensibilité et la spécificité est 24lg formazan 107 spermatozoïdes, une sensibilité de 91,7 % et une spécificité de 81,0 %. Les valeurs prédictives positives et négatives pour ce seuil de coupure sont respectivement de 89,2 et 85 %. La surface calculée de la courbe (SSC) est de 0,88, ce qui donne à penser que la BNT a une excellente</li> </ul>
---	--	--

		capacité à distinguer les individus fertiles des individus infertiles.
<p><b>16- Humain induit par la cryoconservation</b>  <b>Spermatozoïdes dommages de l'ADN est principalement médiée par le stress oxydatif plutôt que l'apoptose</b></p>	<p>L.K. Thomson, S.D. Fleming, R.J. Aitken, G.N. De Iulius, J.-A. Zieschang, and A.M. Clark</p>	<p>• Caractéristiques de la population à l'étude :  L'âge moyen des 60 sujets était de 38,2 ans et variait entre 28 et 50 ans. L'âge n'a eu aucun effet sur aucun des paramètres de l'étude.  La durée moyenne de l'abstinence sexuelle était de 3,1 jours, avec une plage de 0 à 7 jours. Quatre patients s'étaient abstenus pendant moins de jours que le nombre recommandé avant le prélèvement de l'échantillon. Le retrait de ces patients n'a eu aucun effet sur les résultats. Trente-quatre (57 %) des hommes présentaient une analyse du sperme anormale, mais aucun n'avait une asthénocombospermie ou une oligozoospermie grave. Les échantillons ont été congelés en moyenne 76 minutes après leur prélèvement et ont passé en moyenne 14 jours en entreposage avant leur décongélation.  Le pourcentage moyen de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes dans le sperme non fractionné était de 10,2 % et de 13,3 % dans la fraction à haute densité (P, 0,01), le pourcentage moyen de 8 OHG était de 20,9 % dans le sperme non fractionné et de 18,9 % dans la fraction à haute densité.  Fraction [non significative (NS)] et le pourcentage moyen de cellules caspasées positives était de 20,4 % dans le sperme non fractionné et le sperme fractionné, respectivement (P, 0,01).  • Première expérience : comparaison des pourcentages :  Fragmentation de l'ADN du sperme, base oxydative dommages et caspase activation dans les spermatozoïdes avant et après la cryoconservation  Relation entre la fragmentation de l'ADN, 8OHdG et l'activation de caspase dans le sperme frais  L'activation de caspase dans le sperme frais avant la séparation, le pourcentage de</p>

fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes présentait une corrélation très positive avec le pourcentage de 8OHdG ( $r = 0,756$ ,  $P = 0,001$ ).

La même corrélation a été trouvée entre ces deux paramètres dans la fraction à haute densité ( $r = 0,568$ ,  $P = 0,01$ ). Une corrélation très positive a également été relevée entre le pourcentage de fragmentation de l'ADN du sperme et le pourcentage de cellules caspases positives dans les échantillons séparés ( $r = 0,711$ ,  $P = 0,001$ ).

Le pourcentage moyen de fragmentation de l'ADN du sperme et le pourcentage moyen de 8OHdG étaient plus élevés chez les patients dont l'analyse du sperme était anormale (7,4 % contre 12,4 %,  $P = 0,01$  et 15,2 % contre 25,2 %,  $P = 0,001$ , respectivement).

Il n'y avait aucune différence entre ceux qui avaient une analyse du sperme normale et anormale en termes d'activation de la caspase (20,7 contre 20,2 %, NS).

- Effet de la cryoconservation sur la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, les cellules 8OHdG et caspase positives :

La cryoconservation a entraîné une augmentation significative du pourcentage de DNA fragmentation des spermatozoïdes, du pourcentage 8OHdG et du pourcentage de caspases positifs.

La séparation au moyen de DGC n'a pas pu réduire ces augmentations par la suite, et aucune différence significative n'a été observée entre les paires séparées et non séparées après le dégel.

- Relation entre la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, les cellules 8OHdG et caspase positives après cryoconservation :

Une corrélation positive entre le pourcentage de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et le pourcentage de 8OHdG après cryoconservation et



séparation à l'aide de DGC ( $r \frac{1}{4} 0,528$ ,  $P$ , 0,05). La corrélation entre ces deux paramètres n'a pas atteint de signification dans les échantillons non fractionnés ( $r \frac{1}{4} 0,414$ ,  $P \frac{1}{4} 0,07$ ).

La mesure dans laquelle le pourcentage de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et le pourcentage de 8OHdG ont augmenté a également été positivement corrélée dans les échantillons non fractionnés ( $r \frac{1}{4} 0,486$ ,  $P$ , 0,05) et fractionnés ( $r \frac{1}{4} 0,656$ ,  $P$ , 0,01). Une corrélation négative a été établie entre le pourcentage de cellules positives à la caspase et le pourcentage de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes dans les échantillons non fractionnés seulement ( $r \frac{1}{4} 2 0,455$ ,  $P$ , 0,05).

- Deuxième expérience : effet de la génistéine à composer œstrogénique sur les lésions cryogéniques à l'ADN des spermatozoïdes

L'ajout de 50 et de 100 mM de génistéine à la cryoconservation à priori moyen du QASF a eu un effet protecteur important sur l'ADN du sperme en termes de pourcentage de fragmentation de l'ADN du sperme dans la haute, la fraction de densité ( $P$ , 0,001) et l'éjaculat non fractionné ( $P$ , 0,05), et le pourcentage de 8OHdG dans la fraction à haute densité ( $P$ , 0,01) et l'éjaculat non fractionné ( $P$ , 0,01)

Avec l'ajout de 100 mM de génistéine au milieu cryoprotecteur, le pourcentage de fragmentation de l'ADN du sperme (12,2 contre 14,8 %, NS) et le pourcentage de 8 OHdG (20,8 contre 24,6 %, NS) dans la fraction à haute densité sont demeurés inchangés après la cryoconservation.

Le pourcentage de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes dans la fraction de haute densité est également resté inchangé avec l'ajout de 50 mM de génistéine (12,2 contre 15,9 %, N.-É.), mais le pourcentage 8OHdG était

		<p>légèrement plus élevé (20,8 contre 25,4 %, P , 0,05).</p> <p>Les concentrations de génistéine utilisées ont également eu un effet important sur la motilité après le dégel (P, 0,001) et la vitalité (P, 0,001) à l'aide de mesures répétées, mais seuls les échantillons contenant 100 mM de génistéine ont démontré une vitalité nettement plus élevée après le dégel (P, 0,001).</p> <p>Le véhicule de la génistéine, DMSO, n'a eu aucun effet sur le pourcentage de fragmentation de l'ADN du sperme, le pourcentage de 8OHdG, la motilité ou la vitalité par rapport à l'échantillon non traité (P . 0,05 dans tous les cas).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Troisième expérience : effet d'un inhibiteur de la caspase sur les lésions cryogéniques de l'ADN du sperme</li> </ul> <p>La supplémentation du milieu QASF avec 100 mM de l'inhibiteur de la pancaspase Z-VAD(OMe)-FMK n'a eu aucun effet protecteur sur l'ADN des spermatozoïdes en termes de pourcentage de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes ou de pourcentage 8OHdG dans la fraction à haute densité ou l'éjaculation non fractionnée post-dégeler en utilisant des mesures répétées ANOVA. De même, aucun effet protecteur offert par l'inhibiteur de la caspase n'a été observé en termes de motilité ou de vitalité post-dégel.</p>
<p><b>17- Implication des leucocytes séminaux, des espèces réactives d'oxygène et du potentiel de la membrane mitochondriale du</b></p>	<p>A. M. Lobascio, M. De Felici, M. Anibaldi, P. Greco, M. G. Minasi and E. Greco</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dans une première série d'expériences, ils ont corrélé le nombre de leucocytes positifs à la peroxydase avec les paramètres du sperme dans les éjaculations de 125 patients. À savoir, dans chaque</li> </ul>

<p>sperme dans les dommages à l'ADN des spermatozoïdes humains</p>		<p>échantillon, la concentration des leucocytes a été corrélée avec la motilité des spermatozoïdes, la concentration, la fragmentation de l'ADN et la quantité de ROS dans le sperme entier.</p> <p>Une corrélation négative entre le nombre de leucocytes et le pourcentage de motilité des spermatozoïdes (<math>r_s = 0,20</math>; <math>p = 0,02</math>) et le nombre de spermatozoïdes (<math>r_s = 0,22</math>; <math>p = 0,01</math>).</p> <p>Une corrélation positive a été détectée entre le nombre de leucocytes et la concentration totale de ROS (<math>r_s = 0,70</math>, <math>p &lt; 0,001</math>) et le nombre de spermatozoïdes montrant une fragmentation de l'ADN détectée par TUNEL (<math>r_s = 0,43</math>; <math>p = 0,032</math>).</p> <p>Une tendance à la corrélation positive entre le nombre total de spermatozoïdes séminaux et le nombre de spermatozoïdes dont l'ADN était endommagé (<math>r_s = 0,37</math>; <math>p = 0,07</math>).</p> <p>Aucune corrélation significative entre la perte de MMP et la présence de fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes n'a été trouvée (<math>r_s = 0,25</math>; <math>p = 0,08</math>).</p> <p>Une corrélation positive entre le MMP et la motilité des spermatozoïdes (types A et B) (<math>r_s = 0,54</math>, <math>p &lt; 0,001</math>) et la viabilité des spermatozoïdes (spermatozoïdes positifs à l'éosine) (<math>r_s = 0,68</math>, <math>p &lt; 0,001</math>) a été détectée (non montrée).</p>
<p>18- La fragmentation et l'oxydation de l'ADN du sperme sont indépendantes du malondialdéhyde</p>	<p>Nassira Zribi, Nozha Feki Chakroun, Henda Elleuch, Fatma Ben Abdallah,</p>	<p>Dans le groupe d'étude, 21 spermatozoïdes étaient considérés comme asthénozoospermiques et 34 étaient considérés comme non asthénozoospermiques. Le pourcentage de spermatozoïdes dont l'ADN est fragmenté est exprimé par cytométrie en flux et TUNEL.</p>

	<p>Afifa Sellami Ben Hamida, Jalel Gargouri, Faiza Fakhfakh, Leila Ammar Keskes.</p>	<p>Les concentrations moyennes (<math>\pm</math> SD) de MDA dans le sperme et le pourcentage de fragmentation de l'ADN étaient significativement plus élevés dans le groupe asthénozoospermique que dans le groupe non asthénozoospermique (<math>8,81 \pm 1,01</math> vs <math>4,99 \pm 0,76</math> ; <math>8,81 \pm 1,01</math> nmol/107 spermatozoïdes, <math>p = 0,008</math> et <math>28,01 \pm 2,23</math> % contre <math>19,34 \pm 2,55</math> %, <math>p = 0,006</math>, respectivement).</p> <p>Les taux de 8-oxoguanine (<math>\pm</math>SD) ne différaient pas significativement lors de la comparaison des deux groupes (<math>14,63 \pm 1,5</math> % contre <math>13,92 \pm 1,88</math> % ; <math>p = 0,8</math>), respectivement. De nombreuses corrélations significatives ont été trouvées entre les paramètres de base du sperme (niveaux de MDA du sperme et dommages à l'ADN), et la fragmentation de l'ADN du sperme était positivement corrélée à l'oxydation de l'ADN du sperme (<math>p = 0,01</math>; <math>r = 0,33</math>).</p> <p>Concernant les associations entre la fragmentation de l'ADN et les paramètres de routine du sperme : le test TUNEL était corrélé négativement avec la motilité globale des spermatozoïdes (<math>p = 0,001</math> ; <math>r = -0,43</math>) ; La même corrélation négative mais plus faible a été trouvée avec la motilité de type a (<math>p = 0,04</math> ; <math>r = -0,27</math>) et la motilité de type b (<math>p = 0,03</math> ; <math>r = -0,28</math>) ; cependant, il y avait une forte corrélation avec le sexe de la motilité des spermatozoïdes (<math>p &lt; 0,001</math> ; <math>r = -0,65</math>).</p> <p>La même corrélation mais faiblement négative a été trouvée pour la motilité de type a (<math>p = 0,04</math> ; <math>r = -0,27</math>) et la motilité de type b (<math>p = 0,03</math> ; <math>r = -0,28</math>). Cependant, il y avait une forte corrélation avec le sexe de la motilité des spermatozoïdes (<math>p &lt; 0,001</math> ; <math>r = -0,65</math>).</p> <p>Les niveaux de MDA dans le sperme étaient corrélés négativement avec la concentration de sperme (<math>p &lt; 0,001</math> ; <math>r = -</math></p>
--	--	--

		0,57), la motilité totale ( $p = 0,01$ ; $r = -0,35$ ) et le type de motilité ( $p = 0,03$ ; $r = -0,32$ ). Il n'y avait aucune corrélation entre le MDA et la fragmentation de l'ADN ( $p = 0,5$ ) ou l'oxydation de l'ADN ( $p = 0,7$ ).
<b>19- Évaluation des dommages à l'ADN oxydatif favorisés par l'entreposage dans les spermatozoïdes de truites arc-en-ciel inverties selon le sexe</b>	S. Perez-Cerezales , S. Martnez-Páramo , E. Cabrita , F. Martínez-Pastor , P. de Paz , M.P. Herraéz	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effet du stockage dans la fragmentation de l'ADN : Les échantillons conservés à court terme et cryoconservés ont révélé un niveau de fragmentation de l'ADN significativement plus élevé par rapport aux échantillons frais (<math>15 \% \pm 0,1</math> et <math>14 \% \pm 0,56</math> respectivement), mais aucune différence n'a été observée entre les deux procédures de stockage. Le traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilisé comme témoin positif dans les trois types d'échantillons a produit un niveau similaire de fragmentation de l'ADN dans chacun d'eux, allant de <math>17,53 \% \pm 0,91</math> à <math>21,34 \% \pm 1,29</math> dans les échantillons entreposés à court terme et les échantillons frais, respectivement. Des différences dans les fréquences des cellules par classes d'ADN en % ont été détectées entre les trois procédures de stockage. La figure 2 montre que les spermatozoïdes provenant d'échantillons frais présentaient un degré de fragmentation de l'ADN inférieur à 20 %, la plupart des événements affichant moins de 5 % d'ADNt. Dans les échantillons stockés à court terme, la fréquence des classes avec un pourcentage très faible d'ADNt a diminué et il y avait un groupe de cellules bien défini avec un pourcentage d'ADNt supérieur à 40%. Cette population ne figurait pas dans les spermatozoïdes frais ou cryoconservés. Les spermatozoïdes cryoconservés présentaient un profil de fréquence différent, avec une quantité de cellules ayant moins de 5 % d'ADNc que les</li> </ul>

cellules fraîches et une population de spermatozoïdes ayant entre 10 et 30 % d'ADNt. Le traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a produit une variation dans la distribution des cellules par rapport au % d'ADNt, diminuant la fréquence des cellules avec un faible degré de fragmentation de l'ADN et augmentant le rapport des cellules très endommagées.

- Effet de la digestion de l'ADN avec les endonucléases :

Les échantillons cryoconservés et stockés à court terme, l'exposition au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a augmenté la fréquence des cellules ayant plus de 40 % d'ADNt.

Quand une étape de digestion avec ENDIII et FPG était inclus dans le protocole d'essai Comet, il n'y avait pas augmentation de l'ADNt dans les spermatozoïdes frais.

L'action d'ENDIII après traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a produit une augmentation de moyenne d'ADN jusqu'à  $27,52\% \pm 1,75$ , mais aucune différence significative n'a été décelée dans les échantillons traités au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec en ce qui concerne ceux digérés avec FPG. Le % d'ADNt des échantillons de spermatozoïdes conservés pendant cinq jours a révélé que la réaction à ENDIII n'a pas augmenté le % d'ADNt, mais une légère augmentation a été observée après la digestion avec FPG.

Le traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'a pas montré de différences avec les spermatozoïdes non traités. Néanmoins, la réaction ENDIII après une exposition au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a produit une augmentation en % d'ADNt qui n'a pas été observée dans l'essai FPG.

Les digestions enzymatiques n'ont pas augmenté la fragmentation de l'ADN par rapport au contrôle cryoconservé. Comme dans les échantillons frais, l'effet du traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été significatif, augmentant le % d'ADN. Dans ce cas, aucune des différences ont été observées lorsqu'ENDIII et FPG étaient appliqués après une exposition à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effet du stockage sur la viabilité des cellules : Les spermatozoïdes frais avaient une moyenne de 90 % <math>\pm</math> 2,24 cellules viables, alors que ce pourcentage a nettement diminué à 45 % <math>\pm</math> 5,29 dans les spermatozoïdes entreposés à court terme. Les échantillons cryoconservés ont montré 69 % <math>\pm</math> 4,35 de cellules viables. En comparaison avec les résultats du pourcentage de cellules ayant des pourcentages différents d'ADN, nous avons observé que 90 % des cellules dans les échantillons frais avaient moins de 15 % de chromatine fragmentée.</li> </ul> <p>Les échantillons stockés à court terme ont montré 68% de leurs cellules sous cette valeur de fragmentation de l'ADN, alors que seulement 58% des cellules cryoconservées ont montré un degré de fragmentation inférieur à 15%.</p>
<p><b>20 - Effet du statut redox séminal sur la peroxydation lipidique, l'apoptose et la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes d'hommes saoudiens infertiles</b></p>	<p>Sabiha Fatima, Raheek Alwaznah, MS, Ghadeer S. Aljuraiban, Samina Wasi, Manal Abudawood, Mahmoud Abulmeaty, Mohamed Y. Berika, Feda S. Aljaser,</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analyse des paramètres séminaux : L'analyse des paramètres séminaux des groupes étudiés n'a pas montré de différences significatives entre les groupes AST, OAT et le groupe contrôle normozoospermique.</li> <li>• Statut antioxydant total et taux de ROS dans le plasma séminal : Les niveaux moyens de ROS dans le sperme étaient significativement plus élevés dans les groupes AST et OAT par rapport au sperme normal (<math>p &lt; 0,001</math>). Le TAS du sperme dans le groupe infertile par rapport au sperme normal était significativement plus faible dans les groupes AST (<math>p &lt; 0,001</math>) et OAT (<math>p &lt; 0,001</math>) par rapport au groupe témoin.</li> </ul>

- Produits de peroxydation lipidique dans les spermatozoïdes :

Le niveau de 4-HNE, un aldéhyde électrophile et un sous-produit naturel de la LPO, comparé au niveau du groupe fertile normozoospermique, a montré une augmentation très significative dans les groupes OAT ( $p < 0,001$ ) et AST ( $p = 0,003$ ).

- Apoptose et fragmentation de l'ADN : L'exécuteur final de l'apoptose, Caspase 3, a été mesuré pour déterminer l'effet de la production de ROS de sperme sur l'apoptose des spermatozoïdes.

Par rapport aux valeurs observées dans le groupe standard, l'activité moyenne de la caspase-3 s'est avérée significativement plus élevée ( $p < 0,001$ ) dans le groupe OAT et le groupe AST ( $p = 0,005$ ) par rapport aux sujets azoospermes standard.

- Corrélation entre le statut redox du sperme et le 4-HNE, la fragmentation de l'ADN, l'activité de la caspase-3 et les paramètres conventionnels du sperme :

Parmi tous les groupes étudiés, une relation a été trouvée entre le TAS séminal, le ROS séminal, les marqueurs de stress oxydatif du sperme, la fragmentation de l'ADN et les paramètres conventionnels du sperme.

Dans le plasma séminal, il y avait une corrélation négative entre les niveaux de ROS et la PAS ( $r = -0,51$ ,  $p < 0,001$ ). Les niveaux séminaux de ROS ont montré une forte association positive avec les niveaux de 4-HNE ( $r = 0,46$ ,  $p < 0,001$ ), l'activité de la caspase 3 ( $r = 0,53$ ,  $p < 0,001$ ) et les niveaux de fragmentation de l'ADN ( $r = 0,48$ ,  $p < 0,001$ ). La diminution observée des valeurs de TAS séminales chez les mâles infertiles était inversement associée à une activité accrue de la caspase-3 ( $r = -0,22$ ,  $p = 0,028$ ), 4HNE ( $r = -0,36$ ,  $p =$



0,002) et des niveaux d'ADN fragmentation ( $r = -0,39, p < 0,001$ ).

Les niveaux séminaux de ROS ont montré une corrélation négative forte et significative avec la concentration totale de spermatozoïdes. Une association négative similaire a été observée dans la motilité totale des spermatozoïdes ( $r = -0,56, p < 0,001$ ) et la morphologie normale des spermatozoïdes ( $r = -0,61, p = 0,001$ ) dans la population étudiée.

L'augmentation de la fragmentation de l'ADN et de l'activité de la caspase-3 a également montré une forte corrélation négative avec une diminution de la motilité des spermatozoïdes ( $r = -0,58, p < 0,001$  ;  $r = -0,51, p < 0,001$ , respectivement) et une morphologie normale des spermatozoïdes ( $r = -0,48, p < 0,001$  ;  $r = -0,56, p < 0,001$ ) pour tous les groupes d'étude.

La diminution de la concentration de spermatozoïdes n'a pas montré de corrélation significative avec la fragmentation de l'ADN et l'activité de la caspase-3. Nous avons également évalué les associations entre les niveaux de sperme 4-HNE et les paramètres du sperme. Il est nécessaire de vérifier l'orthographe de votre travail.

Une corrélation négative significative a été observée entre les niveaux de 4-HNE, la motilité totale des spermatozoïdes ( $r = -0,62, p < 0,001$ ) et la morphologie normale des spermatozoïdes ( $r = -0,53, p < 0,001$ ).

La concentration de sperme a montré une association inverse ( $r = -0,37, p = 0,004$ ) avec le niveau de 4-HNE dans la population étudiée. Les taux de 4-HNE dans le sperme étaient positivement associés au pourcentage de dommages à l'ADN ( $r = 0,52, p < 0,001$ ) et à l'activité de la caspase-3 ( $r = 0,48, p < 0,001$ ).