

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université de Blida I**  
**Faculté des sciences de Biologie**  
**Département de Biologie des Populations et des Organismes (BPO)**



**Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie**

**Spécialité : Reproduction Animale**

**Thème**

**Intérêt du test de fragmentation d'ADN spermatique (technique Sperm Chromatin Dispersion) en Injection Intracytoplasmique d'un Spermatozoïde (ICSI)**

**Réalisé par :**

- **BOULFEKHAR Rym**
- **BENHAMMOUDA Safa**

**Date de soutenance :**

**19/09/2016**

**Membres de Jury**

Madame DJAZOULI Z.	MCA Université Blida I	Présidente
Madame ZATRA Y.	MAA Université Blida I	Examinatrice
Madame EL –AOUFI Salima	Professeur FSB-USTHB	Promotrice
Madame DJERROUDIB Karima	Embryologiste Clinique TIZIRI	Co-promotrice
Madame Benazouz F.	MAA Université Blida 1	Invitée d'honneur

**Année universitaire : 2015/2016**

## RESUME

La fragmentation de l'ADN spermatique fait référence à des ruptures et des lésions dans le matériel génétique du spermatozoïde, L'impact de cette fragmentation est principalement sur le développement embryonnaire précoce et fausses couches, précoce. L'objectif de ce travail est de déterminer l'effet de la fragmentation de l'ADN spermatique sur les résultats de l'injection Intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI), et identifier la nature de la relation entre l'indice de fragmentation d'ADN (DFI) et les différents paramètres spermatiques.

La technique utilisée est le Sperm Chromatin Dispersion (SCD) qui consiste en une libération partielle des protéines chromatiques : une dispersion des boucles d'ADN autour de l'ADN nucléaire qui reste attaché aux protéines résidus.

Nos principaux résultats ont révélé une faible corrélation ( $P = 0.028$ ) et coefficient de corrélation ( $r = -0.052$ ) entre le taux de DFI et l'âge des patients, pour le tabagisme nous avons observé l'absence de corrélation avec le DFI.

De même, entre l'indice de masse corporelle (BMI) et les résultats de l'indice de fragmentation d'ADN (DFI) et entre la morphologie spermatique (anomalie de la tête) et le DFI. En revanche, Nous avons trouvé une claire corrélation négative entre la mobilité des spermatozoïdes dans l'éjaculat et le DFI, ( $r = -0.178$  ;  $P = 0.034$ ) ce qui signifie que, plus le DFI augmente la mobilité diminue.

Concernant l'issu de l'injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI) nos résultats n'ont pas montré une nette amélioration en termes de grossesses cliniques ou naissance et pas de diminution des fausses couches, ceci dit, ça reste une étude rétrospective réalisée sur une petite série.

Cette présente étude a permis de mieux comprendre et identifier les causes de l'infertilité masculines et leurs impacts sur les paramètres spermatiques et l'issu d'ICSI en corrélation avec l'indice de fragmentation d'ADN spermatique(DFI), et par cela mieux cibler les problèmes d'infertilité et trouver des solutions plus fiables et sûres pour une fertilité meilleure.

**Mots clés :** Infertilité masculine, Fragmentation d'ADN spermatique, Corrélation, Spermatozoïdes.

## ABSTRACT

The spermatic DNA fragmentation refers to fractures and lesions in the genetic material of the sperm. The impact of this fragmentation is primarily on early embryonic development and miscarriages premature. The objective of this work is to determine the effect of the fragmentation of sperm DNA on the results of Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), and identify the nature of the relationship between DNA Fragmentation Index (DFI) and various sperm parameters.

The technique used is the Sperm Chromatin Dispersion (SCD), which consists of partial discharge chromatic proteins: a dispersion of the DNA loops around the nuclear DNA, which remains attached to the protein residues.

Our main results revealed a low correlation ( $P = 0.028$ ) and correlation coefficient ( $r = -0.052$ ) between the DFI rate and patient age, for smoking we observed no correlation with the DFI.

Similarly, between the BMI and the results of DFI, and between sperm morphology (abnormality of the head) and the DFI. However, we found a clear negative correlation between the mobility of sperm in the ejaculate and the DFI ( $r = -0.178$ ,  $P = 0.034$ ) which means that more DFI increases the mobility decreases.

About the outcome of Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), our results have not shown a clear improvement in clinical pregnancy, births and no reduction in miscarriages, the reason could be that the study was retrospective and it has been done on a small sample.

This study, allowed us to understand more profoundly the causes of male infertility, their impact on semen parameters and the outcome of ICSI in correlation with spermatic DNA Fragmentation Index (DFI), and that for a better target infertility problems and find more reliable solutions for better fertility.

**Keywords:** Male infertility, spermatic DNA fragmentation of, Correlation, Sperm.

## ملخص

يعرف انكسار الحمض النووي المنوي بتشتت وانحلال في المادة الوراثية للحيوانات المنوية مما يؤثر على المراحل الأولى من نمو الجنين وبالتالي الإجهاض. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد تأثير انكسار الحمض النووي للحيوانات المنوية على نتائج التلقيح الاصطناعي المجهري، والتعرف على طبيعة العلاقة بين مؤشر انكسار الحمض النووي وخصائص الحيوانات المنوية المختلفة. التقنية المستعملة هي اختبار انتشار الكروماتين المنوي الذي يعمل على التفريغ الجزئي لبروتينات الكروماتين وتشتت حلقات من الحمض النووي المنوي حول الحمض النووي للنواة التي لا تزال متعلقة على بقايا البروتينات.

كشفت نتائجنا الرئيسية عن ارتباط منخفض بين مؤشر انكسار الحمض النووي وعمر المرضى، اما بالنسبة للتدخين لاحظنا عدم وجود ارتباط بينه وبين مؤشر انكسار الحمض النووي وبالمثل بين مؤشر كتلة الجسم ومورفولوجيا الحيوانات المنوية ونتائج مؤشر انكسار الحمض النووي، ومع ذلك وجدنا علاقة طردية عكسية واضحة بين حركة الحيوانات المنوية في السائل المنوي ومؤشر انكسار الحمض النووي، مما يعني انه كلما ارتفع مؤشر انكسار الحمض النووي كلما زاد انخفاض حركة الحيوانات المنوية.

اما فيما يتعلق بنتائج الاصطناعي المجهري فان الدراسة لم تظهر تحسنا واضحا في الحمل الكلينيكي أو نسبة الولادة، وأي انخفاض في الإجهاض، وهذا راجع الى انها دراسة لملفات ولعينة محددة. اتاحت هذه الدراسة لنا فهما أفضل والتعرف على أسباب العقم عند الرجال وتأثيرها على خصائص الحيوانات المنوية وأيضا على نتائج التلقيح الاصطناعي المجهري مع مؤشر انكسار الحمض النووي المنوي، وهذا من اجل تخصيص دراسة أعمق لمشاكل العقم وإيجاد حلول موثوقة واكيدة لتحسين الخصوبة .

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

## REMERCIEMENTS

Nous remercions tout d'abord Dieu Tout Puissant, pour nous avoir donné cette envie et cette passion pour la science et la force et la patience pour réaliser ce mémoire.

Nous remercions particulièrement notre promotrice Madame **El Aoufi Salima** pour sa confiance, son aide de tous les jours pour l'accomplissement de ce projet.

Nous tenons à remercier aussi notre Co-promotrice et le personnel de la clinique TIZIRI, Madame **Djerroudib K.** pour tous ses conseils précieux, son aide pour la documentation et la rédaction de ce mémoire.

Nous ne saurions oublier dans ces remerciements les responsables de la clinique TIZIRI : le professeur **Boucekkine F.** et le docteur **Oumeziane A.** pour leur accueil au sein de leur service.

Nous remercions enfin toutes celles et ceux qui, de près ou de loin, nous ont aidé à réaliser ce mémoire et tout particulièrement le personnel du laboratoire de spermologie. Mesdemoiselles **Boudouaou F, Kanoun W, Haddad H. et Lahmel M.**

Nos plus vifs remerciements s'adressent aux membres du jury qui ont bien voulu examiner et juger notre travail ;

- Madame **DJAZOULI Z.** MCA à l'Université de Blida I, qui a accepté de présider ce jury et
- Madame **ZATRA Y.**, MAA à l'Université Blida comme examinatrice.

Nous remercions chaleureusement, tous nos enseignants qui nous ont accompagné durant tout notre parcours universitaire, spécialement à Monsieur **Bessaad A.** qui nous a ouvert la porte de ce domaine, Mesdames **Sayad M., Zatra Y., Djazouli, Keskess F., Benazouz F.,** et tous les étudiants de Master 2 spécialité « Reproduction Animale » spécialement l'étudiant **Si Saber Salim** qui nous a beaucoup aidé par ses conseils.

## DEDICACES

Nous dédions ce modeste travail:

A nos chers parents

A nos frères et sœurs

A tous les membres de nos familles

A tous nos collègues et amis

Sans oublier tous ceux qui nous ont prodigué leurs connaissances depuis notre tendre enfance à ce jour, qu'ils en soient remerciés et que ceci témoigne de notre reconnaissance éternelle envers eux, aussi on ne terminerait pas sans exprimer notre gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, n'ont pas épargné leurs efforts pour l'élaboration de ce travail de recherche.

**RYM** : Je dédie ce travail à mes chers parents, mes frères (**Adel, Youcef**) à ma petite sœur chérie (**Meriem**), mon oncle et sa femme.

**SAFA** : Je dédie ce modeste travail :

**A mes chers parents**, mes premiers encadrant depuis ma naissance, qu'ils trouvent ici l'hommage de ma gratitude qui, si grande qu'elle puisse être, ne sera jamais à la hauteur de leurs sacrifices et leurs prières pour moi et la confiance qu'on m'a accordé, ainsi que ma très chère grand-mère que j'aime éternellement.

**A mes sœurs et frère, Aicha, Zakaria, Marwa** et mon neveu **Iyad** mon petit bout de chou à qui je souhaite plein de joie de réussite et de sérénité, je vous aime...

**A tous les membres de ma famille** surtout ma tante **Massika** et son mari, mon oncle Mohammed et sa femme pour leurs chaleureux accueil et leurs soutien....

**A mes chers cousines et cousins** les plus chers que j'aime beaucoup

**A mon spéciale chère Binôme Rym** à qui je souhaite une bonne continuation et que du bonheur

**A mon équipe d'amour : Hiba, Dounia, Wissem, Wissam et Mounia ...**

**A mes amis : Billel, Riadh, Anes, Okba, Samy et Oussama....**

Vous qui me sont chers, vous trouvez ici l'expression de mes sentiments les plus dévoués et mes vœux les plus sincères

Que dieu le tout puissant vous préserve tous et vous procure sagesse et bonheur

## SOMMAIRE

RESUME.

REMERCIEMENTS.

LISTE DES FIGURES.

LISTE DES TABLEAUX.

LISTE DES ABREVIATIONS.

INTRODUCTION GENERALE.....1

### CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

I. ANATOMO-PHYSIOLOGIE DE L'APPAREIL GENITALE MALE.....2

I.1. Les voies génitales de l'homme.....2

I.1.1. Epididyme .....2

I.1.2. Les glandes annexes .....2

I.1.3. Le pénis .....2

I.1.4. Les testicules .....3

I.2. Processus de la spermatogenèse dans le tube séminifère.....3

I.2.1. La spermatogenèse .....3

I.2.2. La Spermiogénèse .....5

I.3. Cytophysiologie de la spermatogenèse .....8

II. INFERTILITE MASCULINE.....9

II.1. Anomalies de l'éjaculation.....9

II.2. Cause immunologique .....9

II.3. Anomalies congénitales .....9

II.4. Infection des glandes annexes .....10

II.5. Les leucocytes .....10

II.6. Varicocèle .....10

II.7. Causes iatrogéniques .....10

II.8. Radiothérapie .....10

II.9. Chimiothérapie .....11

II.10. L'Obésité .....11

II.11. Le tabagisme .....11

II.12. L'alcool .....12

II.13. La chaleur .....12

II. 14. Infertilité idiopathique .....12

III. ADN SPERMATIQUE.....13

III.1. Structure d'ADN .....13

III.2. Structure de la chromatine spermatique .....13

III.3. La relation entre la structure chromatique et l'altération d'ADN chez les spermatozoïdes des mammifères .....16

III.4. Les télomères et la reproduction masculine .....16

III.5. Fragmentation de l'ADN spermatique .....17

III.5.1. Fragmentation d'ADN pendant la spermiogénèse .....17

III.5.2. Les différentes causes de fragmentation d'ADN spermatique .....18

III.6. Les différents tests de fragmentation d'ADN spermatique .....22

<b>IV. LES TECHNIQUES DE PMA</b> .....	<b>27</b>
<b>IV.1. Stimulation ovarienne</b> .....	<b>27</b>
<b>IV.2. Recueil et sélection des spermatozoïdes</b> .....	<b>27</b>
<b>IV.3. Ponction et recueil folliculaire</b> .....	<b>27</b>
<b>IV.4. Micro-injection</b> .....	<b>27</b>
<b>IV.5. Culture cellulaire</b> .....	<b>28</b>
<b>IV.6. Transfert embryonnaire</b> .....	<b>28</b>
<b>IV.7. Vitrification embryonnaire</b> .....	<b>28</b>

## **CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES**

<b>II. PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....	<b>29</b>
<b>II.1. Introduction</b> .....	<b>29</b>
<b>II.2. Exploration biologique</b> .....	<b>29</b>
<b>II.3. La Spermoculture</b> .....	<b>30</b>
<b>II.4. Spermogramme</b> .....	<b>30</b>
<b>II.4.1. Examen macroscopique</b> .....	<b>30</b>
<b>II.4.2. L'étude microscopique du sperme</b> .....	<b>31</b>
<b>II.4.3. Le spermocytogramme</b> .....	<b>33</b>
<b>II.5. Test de migration et survie (TMS)</b> .....	<b>35</b>
<b>II.6. Test de Fragmentation d'ADN(SCD)</b> .....	<b>36</b>
<b>II.6.1. Principe</b> .....	<b>36</b>
<b>II.6.2. Description du Kit</b> .....	<b>36</b>
<b>II.6.3. Protocole</b> .....	<b>36</b>
<b>II.6.4. Coloration</b> .....	<b>37</b>
<b>II.6.5. Classification</b> .....	<b>38</b>
<b>II.6.6. Interprétation des résultats</b> .....	<b>38</b>

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>III. Analyse Statistique</b> .....	<b>39</b>
<b>III.1 EXPOSER DES RESULTATS</b> .....	<b>39</b>
<b>III.2 Corrélation entre l'âge et le DFI</b> .....	<b>41</b>
<b>III.3 Corrélation entre le tabagisme et le DFI</b> .....	<b>42</b>
<b>III.4 Etude de la relation entre le DFI et différents paramètres standards</b> .....	<b>43</b>
<b>III.4.1. volume</b> .....	<b>43</b>
<b>III.4.2. concentration du sperme</b> .....	<b>43</b>
<b>III.4.3. mobilité</b> .....	<b>45</b>
<b>III.5 Corrélation entre BMI et DFI</b> .....	<b>46</b>
<b>III.6 Corrélation entre la morphologie spermatique (anomalie de la tête) et le DFI</b> .....	<b>47</b>
<b>III.7 DFI et qualité embryonnaire</b> .....	<b>48</b>
<b>III.8. DFI et issu d'ICSI</b> .....	<b>48</b>

**CONCLUSION**.....50

**RECOMMANDATION**.....51

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**ANNEXES**



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Coupe sagittale de l'appareil génital masculin.....	2
<b>Figure 2 :</b> Structure anatomique d'un testicule humain.....	3
<b>Figure 3 :</b> Schéma de la phase de multiplication des cellules germinales mâles.....	4
<b>Figure 4 :</b> Coupe transversale de tube séminifère.....	5
<b>Figure 5 :</b> modifications cytologiques au cours de la spermiogénèse .....	7
<b>Figure 6 :</b> Ultra structure du spermatozoïde humain .....	7
<b>Figure 7:</b> Les différentes composantes de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire.....	8
<b>Figure 8:</b> DNA fragmentation.....	14
<b>Figure 9:</b> <i>Donut-Loop model for sperm chromatin structure</i> .....	15
<b>Figure 10:</b> Schéma représentatif de la relation entre la longueur des télomères et le développement chez les mammifères.....	17
<b>Figure 11. :</b> Le rôle de Fas pendant la spermatogenèse chez l'homme.....	18
<b>Figure 12:</b> Les facteurs majeurs de fragmentation d'ADN spermatique.....	22
<b>Figure 13:</b> schéma de la technique TUNEL.....	24
<b>Figure 14 :</b> Test Comète.....	25
<b>Figure 15:</b> Observation des différents stades de la fécondation jusqu'à la blastulation.....	28
<b>Figure 16:</b> Papier PH.....	30
<b>Figure 17:</b> évaluation de la viscosité du sperme.....	31
<b>Figure 18 :</b> cellule Malassez.....	32
<b>Figure 19:</b> Spermascore.....	33
<b>Figure 20:</b> Ferticult-Flushing.....	35
<b>Figure 21:</b> gradient PureSperm.....	35
<b>Figure 22:</b> les étapes du test de fragmentation d'ADN.....	37
<b>Figure 23 :</b> Classification des différents diamètres d'halos.....	38
<b>Figure 24 :</b> La qualité spermatique chez les patients de la population étudiée.....	40
<b>Figure 25 :</b> Corrélation entre le DFI et l'âge.....	41
<b>Figure 26 :</b> Corrélation entre le tabagisme et le DFI.....	42
<b>Figure 27 :</b> Corrélation entre Le Volume et le DFI.....	43

<b>Figure 28</b> : corrélation entre la concentration des spermatozoïdes et le DFI.....	44
<b>Figure 29</b> : les moyennes de DFI en fonction de la concentration des spermatozoïdes chez de groupes de patients.....	44
<b>Figure 30</b> : corrélation entre la mobilité (a+b) en fonction de DFI.....	45
<b>Figure 31</b> : Corrélation entre BMI et DFI.....	46
<b>Figure 32</b> : les moyennes de DFI des deux groupes en fonction des valeurs des formes typique des spermatozoïdes.....	47
<b>Figure 33</b> : Comparaison de l'issu d'ICSI dans deux groupes (avec et sans DFI).....	48
<b>Figure 34</b> :Stratégie de la prise en charge diagnostic-thérapeutique en infertilité masculine.....	51

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I :</b> Avantages et inconvénients des tests SCD TUNEL et SCSA .....	26
<b>Tableau II(A) :</b> présentation de la série.....	29
<b>Tableau II(B) :</b> présentation de la série.....	29
<b>Tableau III :</b> représentant les paramètres de mobilité des spermatozoïdes.....	31
<b>Tableau IV:</b> représentant les critères des normalités du sperme selon l’OMS.....	34
<b>Tableau V:</b> résultats donnés par le test de Shapiro-Wilk de la normalité des différents paramètres...	39
<b>Tableau VI :</b> les paramètres spermatique de la population de l’étude.....	39

## LA LISTE DES ABREVIATIONS

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AO** : Acridine orange

**BMI** : Indice de masse corporelle

**CMA3** : Chromomycine A3

**DDT** : Dichlorodiphényltrichloroéthane

**DFI** : Indice de fragmentation d'ADN

**DTT**: Dithiothréitol

**d-UTP**:2'-deoxyuridine, 5'-triphosphate

**Fas**: Apoptosis stimulating fragment

**FasL**: Ligand de Fas

**FIV**:Fécondation *In vitro*

**FSH**: Folliculo-stimulating hormone

**GnRH**: Gonadotrophine releasing hormone

**Gy**: Le **gray** (symbole **Gy**)l'unité dérivée de dose absorbée du système international (SI) d'unités

**ICSI**: Intracytoplasmic Sperm Injection

**IgA** :Immunoglobuline A

**IgG** :Immunoglobuline G

**IgM** :Immunoglobuline M

**IUI** : Insémination intra-utérine

**LH**: Luteinizing hormone

**Min**: Minute

**ml**: Millilitre

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**P1** : Protamine 1

**P2** : Protamine 2

**Pb** : paire de bases

**PCBs** :Polychlorobiphényles

**PH** : Potentiel d'hydrogène

**PMA** : Procréation médicalement assistée

**ROS**: Reactive oxygen species

**SCD**: Sperm chromatin dispersion

**SCSA**: Spermchromatin structure assay

**TdT**: Désoxynucléotidyle transferase

**TMS**: test de migration et de survie

**TUNEL**: TerminalUridine Nick-End labeling

**WHO**: World Health Organization



## INTRODUCTION GENERALE

L'infertilité touche un nombre croissant de couples en âge de procréation. On explique ce phénomène par une plus grande initiative des couples à dévoiler leur infertilité et de ce fait, à consulter et par une augmentation réelle de l'incidence de cette maladie. Dans le monde, plus de 70 millions de couples souffrent d'infertilité (**Boivin *et al.*, 2007**).

L'infertilité est communément définie comme l'impossibilité pour un couple de concevoir une grossesse après douze 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 avance le chiffre de 300 000 couples mariés, qui ne parviennent pas à concevoir un enfant, de manière naturelle (**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 appréciée en utilisant le système de la classification proposé par l'OMS (**Rowe *et al.*, 1993**). Les étiologies masculines de la stérilité se manifestent généralement par un changement d'un ou plusieurs paramètres du sperme. Cependant, les tests évaluant la fertilité masculine demeurent peu prédictifs de la survenue d'une grossesse, il s'est avéré difficile de définir une valeur seuil des tests appliqués. Ils font ainsi l'objet de nombreuses controverses quant à leur utilité dans le domaine de la Procréation Médicalement Assistée (PMA) (**Rowe *et al.*, 1993**).

Les progrès récents en biologie de la reproduction ont amélioré la compréhension de la physiologie des spermatozoïdes et des mécanismes impliqués dans la fécondation (**Sergrie *et al.*, 2005**). Ainsi, la chromatine spermatique et l'intégrité d'ADN est essentielle pour s'assurer que le spermatozoïde fécondant puisse soutenir le développement embryonnaire dans le seul but est d'aboutir à une naissance (**Barratt *et al.*, 2010**).

L'objectif de cette étude est de déterminer la nature de la relation entre l'indice de fragmentation d'ADN (DFI) et les différents paramètres spermatique standards et de déterminer l'utilité clinique du test de la fragmentation d'ADN(SCD) en PMA(ICSI).

**CHAPITRE I :**  
**RAPPEL**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**



# I. ANATOMO-PHYSIOLOGIE DE L'APPAREIL GENITALE MALE.

## I.1. Les voies génitales de l'homme

### I.1.1. Epididyme

Une structure en forme de virgule. Sa tête, qui contient et reçoit les spermatozoïdes des *canalicules efférents*, recouvre la face supérieure du testicule. Son corps et sa queue, qui repose sur la face postéro-latérale du testicule, renferment la partie très pelotonnée de l'épididyme, appelée *canal épидидymaire* (Marieb *et al.*, 1999).

### I.1.2. Les glandes annexes

L'éjaculat est constitué par un mélange de sécrétions s'effectuant en 4 fractions et les deux tiers des spermatozoïdes sont contenus dans la première moitié de l'éjaculat :

- Fraction pré-éjaculatoire : au moment de l'excitation sexuelle, les sécrétions proviennent des glandes de Cowper qui sembleraient jouer un rôle de lubrification pour l'écoulement du sperme.
- Provenant des glandes prostatiques contient des enzymes qui permettant une liquéfaction de l'éjaculat.
- Fraction principale : un mélange de sécrétions prostatiques et vésicules séminales impliqués dans la formation du coagulum séminal.
- Fraction terminale : constituée des sécrétions des vésicules séminales et est plus fluide (Jouannet, 2001).

### I.1.3. Le pénis

Le pénis est l'organe de la copulation, destiné à déposer les spermatozoïdes dans les voies génitales de la femme (Marieb *et al.*, 1999). Le pénis comprend une racine fixe, un *corps* mobile et se termine par un renflement, le *gland* du pénis. Le pénis est un organe spécialisé composé de trois colonnes de tissus érectile qui se remplissent de sang (Figure 1), permettant la pénétration du pénis dans le vagin pendant les rapports sexuels (Van de Graff et Rhees, 2002).

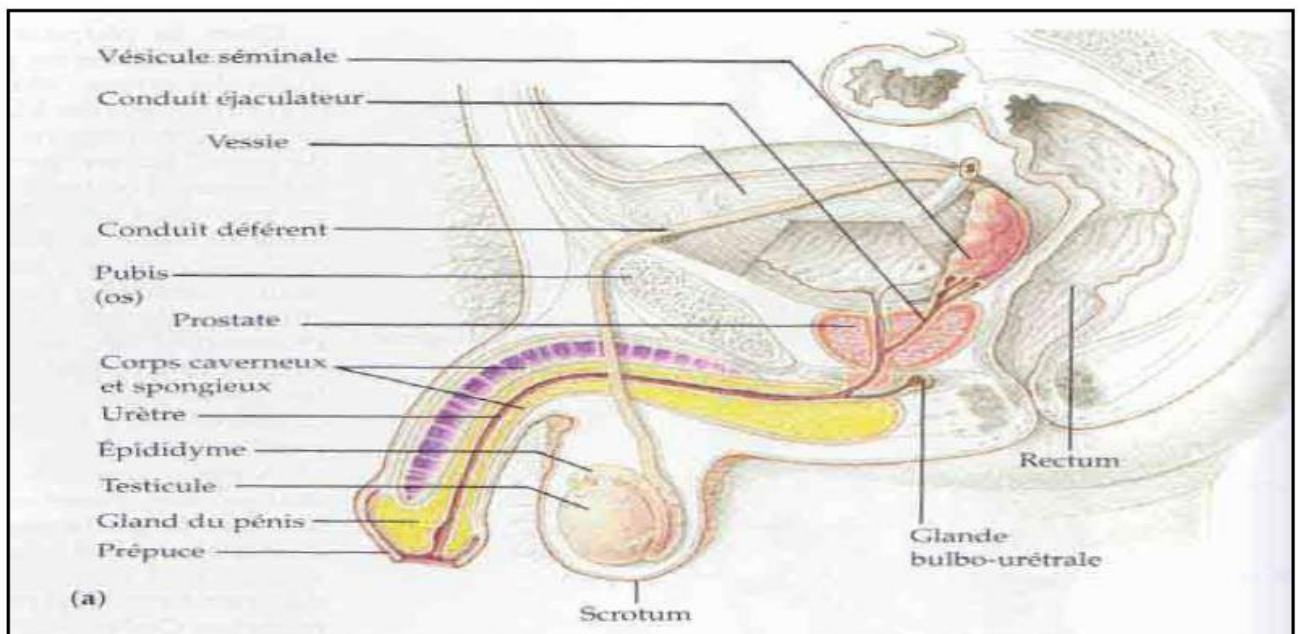


Figure 1 : Coupe sagittale de l'appareil génitale masculin. (bailleul *et al.*, 1991).

### I.1.4. Les testicules

Gonades males productrices de spermatozoïdes (Mariebet *et al.*, 1999). Les testicules sont enveloppés dans un sac de peau, *scrotum* (Van de Graff et Rhees, 2002), chaque testicule est recouvert de deux couches de tissu ; la *tunique vaginale* externe et la *tunique albuginée* interne (Van de Graff et Rhees, 2002). Des projections de l'albuginée forment les cloisons de testicule, qui divisent celui-ci en 250 à 300 lobules dont chacun renferme de un à quatre *tubules séminifères* contournés qui fabriquent les spermatozoïdes (Mariebet *et al.*,1999). Les tubules séminifères contournés de chaque lobule convergent vers un tubule séminifère droit qui transporte les spermatozoïdes jusqu'au *rete testis* (Mariebet *et al.*,1999) (Figure 2 ).

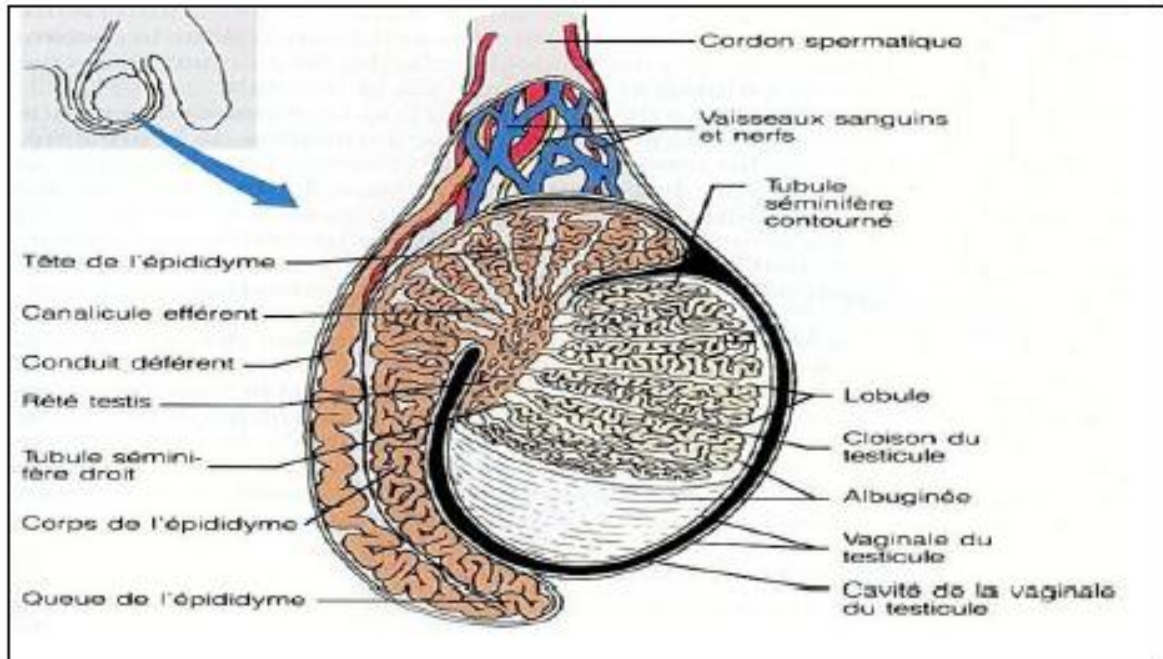


Figure 2 : Structure anatomique d'un testicule humain (Nazzal, 2002).

## I.2. Processus de la spermatogénèse dans le tube séminifère

### I.2.1. La spermatogénèse

La spermatogénèse est le processus combiné de prolifération cellulaire, de division méiotique et de maturation cellulaire qui aboutira à la formation de spermatozoïdes matures ; lesquels acquerront leur pouvoir fécondant dans l'épididyme (Clermont, 1972), (Kerr *et al.*, 2006). Ce processus s'opère dans les tubules séminifères à l'intérieur des quels les cellules de Sertoli, par le biais de leurs extensions cytoplasmiques, assurent un support au développement des cellules germinales (Volg, 1988). Les cellules de Sertoli représentent la structure unique des tubules séminifères permettant la migration des cellules de la lignée spermatique de la membrane basale vers la lumière du tubule au fur et à mesure que la différenciation cellulaire s'effectue (Kerr *et al.*, 2006). Les spermatozoïdes matures sont ensuite relâchés dans la lumière des tubules séminifères d'où ils seront acheminés et conservés dans l'épididyme en attendant l'éjaculation.

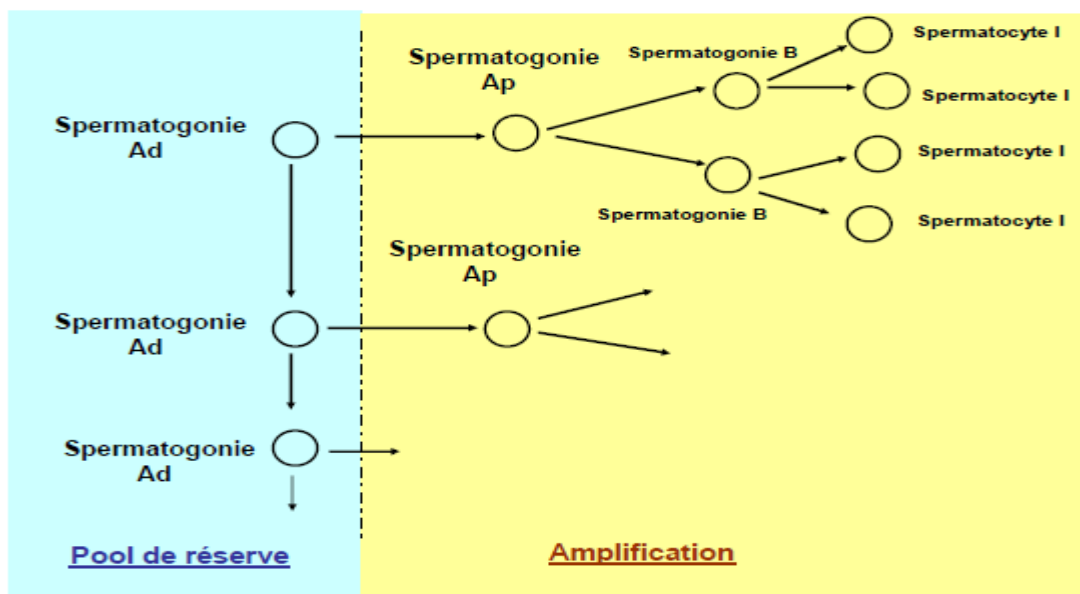
- **La phase de multiplication**

Les spermatogonies sont les cellules germinales mâles retrouvées en périphérie dans les tubules séminifères. Une coupe transversale d'un tubule séminifère est présentée à la (Figure 4). Certaines spermatogonies subissent une série de divisions mitotiques permettant ainsi de maintenir leur nombre. Chez l'humain, on distingue deux types de spermatogonies ; le type A et le type B (Clermont, 1972). Les spermatogonies de type A sont dites A pâles ou A foncées selon leurs caractéristiques morphologiques (Clermont, 1972), (Amann, 2008). Les cellules de type A foncées sont des spermatogonies de réserve se divisant rarement mais qui, sous l'effet d'un stimulus encore inconnu, se différencient en spermatogonies de type A pâles. A partir des cellules souches (cellules diploïdes), se forment plusieurs générations de spermatogonies:

- ❖ **Spermatogonies souches** : Ad (d= dark) : noyau foncé, à chromatine finement granuleuse, avec au moins une vacuole centrale claire.
- ❖ **Spermatogonies poussiéreuses**: Ap (p=pâle) : noyau clair, à chromatine fine renfermant un ou plusieurs nucléoles.
- ❖ **Spermatogonies croûteuse**: (B) : noyau plus au moins foncé, à chromatine disposée en bloc.

Les spermatogonies se multiplient par mitoses normales, la cellule de base est la spermatogonie Ad qui se divise en 2 :

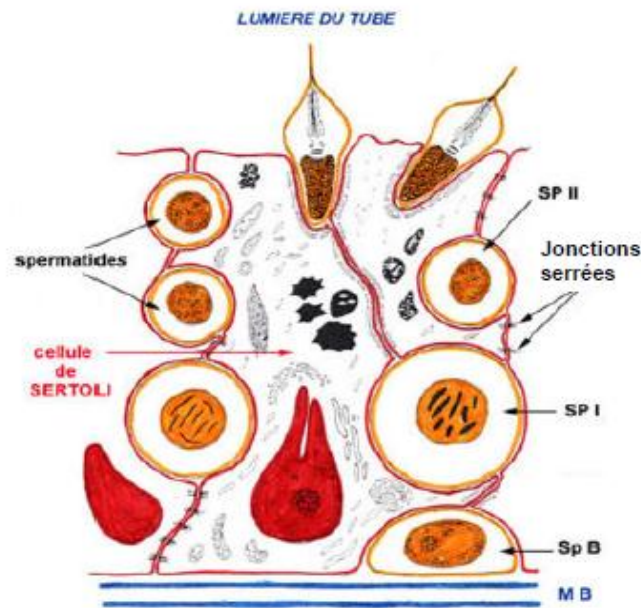
- ❖ Spermatogonie Ad : reste cellule souche (pool de réserve).
- ❖ Spermatogonie Ap qui elle-même se divise en deux. Elle donne deux Spermatogonies B. (Figure 3)



**Figure3** : Schéma de la phase de multiplication des cellules germinales mâles (Humeau et al., 2005).

- **La phase d'accroissement**

Les spermatogonies de dernière génération cessent de se diviser, augmentent de volume et se transforment en spermatocytes de premier ordre (cellules diploïdes), qui se bloquent dans les stades initiaux de la prophase méiotique jusqu'à la puberté.



Mb: membrane basale  
 SpB: spermatogonie B  
 Sp I: spermatocyte I  
 Sp II: spermatocyte II

**Figure 4** : Coupe transversale de tube séminifère (Humeau *et al.*, 2005)

- **La phase de maturation**

Les spermatocytes I subissent la méiose : deux divisions successives qui vont entraîner la réduction de moitié du nombre des chromosomes et de la quantité d'ADN.

- ❖ **Première division de méiose ou division réductionnelle**

Les spermatocytes I ( $2n$  chromosomes,  $2q$  ADN) doublent leur quantité d'ADN ( $4q$  ADN) puis subissent cette première division qui va aboutir à la formation de 2 spermatocytes II (cellules haploïdes) mais à  $2q$  ADN et ne contenant qu'un seul chromosome sexuel (X ou Y). Cette phase est longue et dure plusieurs jours (23 jours) (Amann, 2008), (De Krester, 2007).

- ❖ **Deuxième division de méiose ou division équationnelle**

Elle aboutit, à partir d'un spermatocyte II à 2 spermatides à ( $n$  chromosomes,  $q$  ADN). Elle est courte et dure quelques heures.

### I.2.2. La Spermiogénèse

La spermiogénèse est un processus de maturation et de métamorphose cellulaire permettant la transformation des spermatides rondes en une structure ultra organisée : le spermatozoïde mobile. Cette étape ne comporte aucune division cellulaire, mais concerne plutôt la morphogénèse de l'acrosome, la condensation nucléaire, le développement du flagelle, la réduction du cytoplasme, la réorganisation de ses organites et la spermiation (Kerr *et al.*, 2006), (De Krester 2007).

- **La formation de l'acrosome**

L'appareil de Golgi fournit de nombreuses vésicules qui confluent pour donner une vésicule unique: la vésicule pro-acrosomique. Cette dernière, se plaque et s'étale au niveau du pôle antérieur du noyau sous forme d'un capuchon acrosomique : c'est l'acrosome, qui est très riche en enzymes hydrolytiques (hyaluronidase, acrosine, etc.) (Kerr *et al.*, 2006).

- **La formation du flagelle**

Il se développe à partir des deux centrioles, qui se trouvent d'abord à proximité de l'appareil de Golgi.

-Le centriole proximal : Il vient se loger dans une légère dépression du noyau au pôle opposé à l'acrosome et il ne sera pas modifié.

-Le centriole distal : Il disparaît progressivement et il est remplacé par une structure complexe en forme d'entonnoir : structure axonémale. Pendant que s'élabore cette structure, les microtubules du centriole distal s'allongent et s'organisent en un axonème typique (9 doublets périphériques et un doublet central). Cet axonème s'allonge et émerge de la cellule en repoussant la membrane plasmique (**Kerr et al., 2006**).

- **La condensation du noyau**

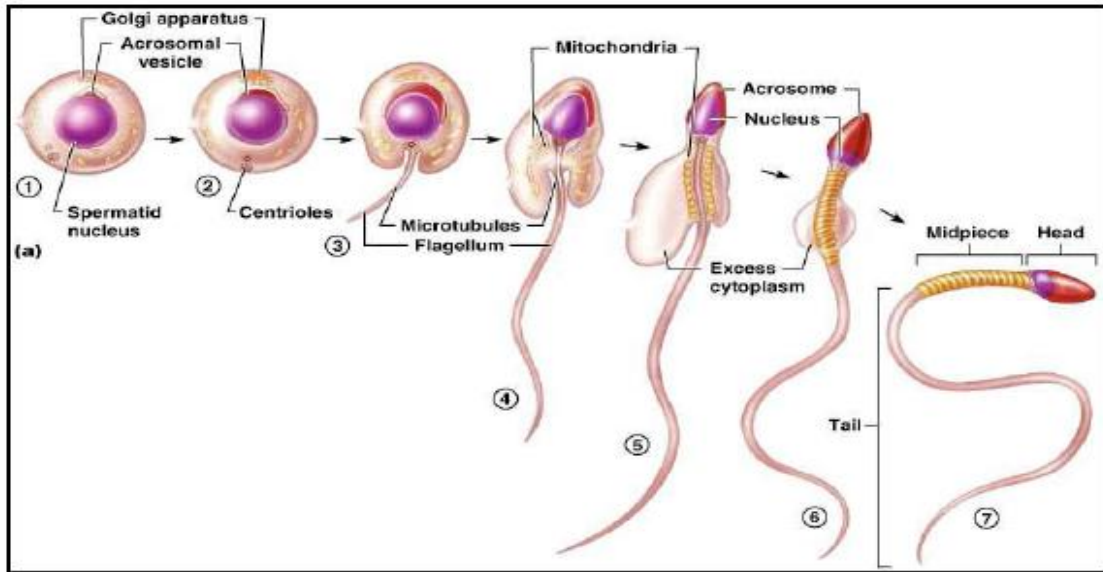
Le noyau devient de plus en plus petit, se condense et adopte sa forme typiquement aplatie. Il est coiffé à sa partie antérieure par l'acrosome. Le noyau et l'acrosome forment la tête du spermatozoïde (**De Krester, 2007**).

- **La réduction du cytoplasme et la réorganisation de ses organites**

La structure modifiée de l'axonème formant le point d'articulation avec le noyau est la pièce de connexion (relie la pièce intermédiaire à la tête dans le spermatozoïde mature).

Les fibres externes denses et l'enveloppe fibreuse sont développées au fur et à mesure que le processus de la spermiogénèse progresse. La pièce intermédiaire procure non seulement une stabilité au flagelle, mais pourrait aussi jouer un rôle d'échafaudage moléculaire dans le positionnement d'enzymes clés, tels que CatSper1 (hyperactivation et capacitation) et Calcium ATPase1 (hyperactivation) nécessaires à la mobilité du spermatozoïde (**De Krester, 2007**).

L'enveloppe de mitochondries de la pièce intermédiaire se forme à la fin de la réorganisation du cytoplasme et des organites. Les mitochondries restées en périphérie de la spermatide se rejoignent en spirale autour de la région proximale du flagelle (la pièce intermédiaire dans le spermatozoïde mature). Cette forme hélicoïde offre moins de résistance au fléchissement (**Kerret et al., 2006**). Survient ensuite la séparation du spermatozoïde de la cellule de Sertoli (la spermiation) durant laquelle le cytoplasme, qui a migré en position caudale, est désagrégé et par la suite phagocyté par les cellules de Sertoli. (**Figure 5**)

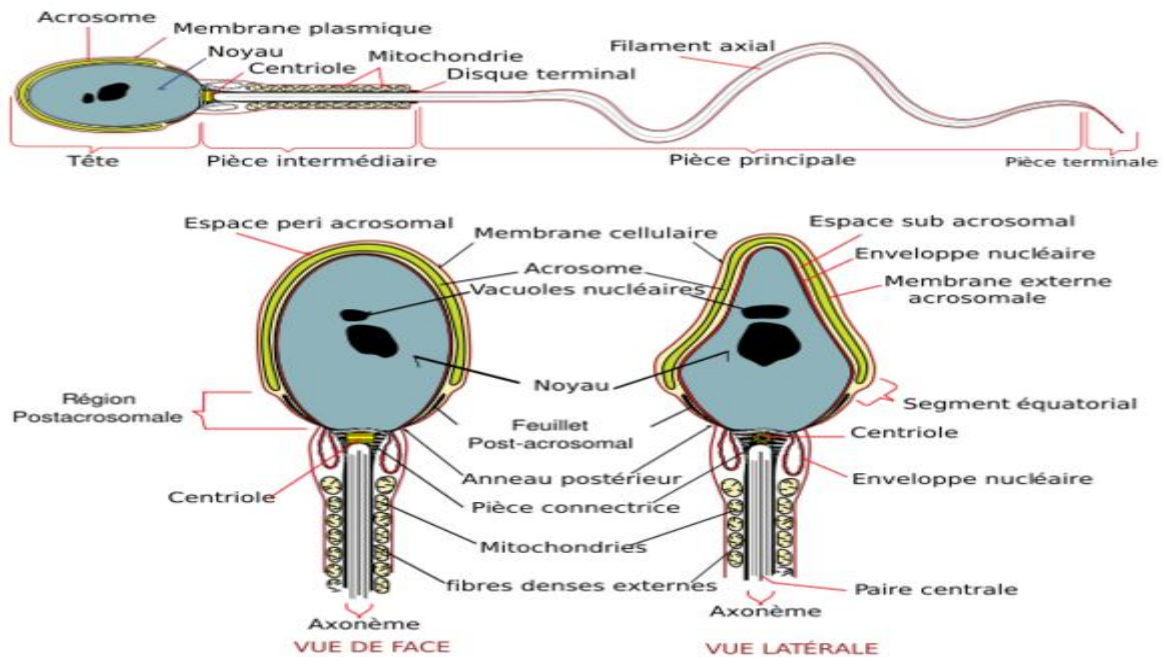


**Figure 5** : Schéma représentatif des modifications cytotogiques au cours de la spermiogénèse (Blanc *et al.*, 1998).

- **La maturation post-testiculaire**

Les spermatozoïdes relâchés dans la lumière des tubules séminifères ne sont pas encore fonctionnels et, de ce fait, sont incapables de féconder un ovocyte. C'est lors de leur passage dans l'épididyme qu'ils subiront une série de changements qui leur permettront d'acquies leur pouvoir fécondant (mobilité progressive, habileté à féconder un ovocyte).

Un de ces changements implique une modification, par des protéines de l'épididyme, de l'emplacement des lipides et des protéines de la membrane plasmique des spermatozoïdes afin de former des complexes de signalisation essentiels à la fécondation (Cornwall, 2009).



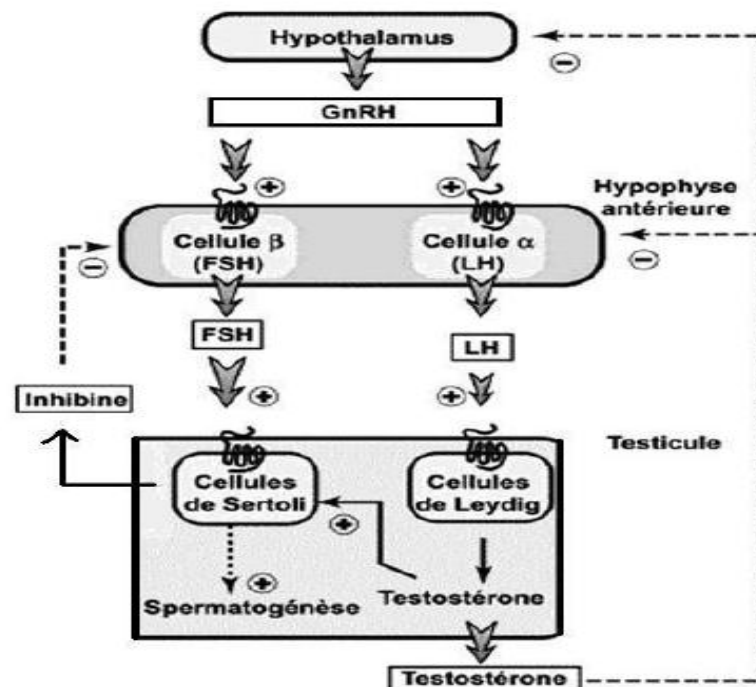
**Figure6** : Ultra structure du spermatozoïde humain. Schéma de la cellule en coupe longitudinale. (Pei Ph, 2005).

### I.3.Cytophysiologie de la spermatogénèse

La fonction testiculaire est régulée en grande partie par l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire. L'hypothalamus libère la GnRH qui agit en se liant à des récepteurs spécifiques situés dans l'hypophyse antérieure donnant le signal de sécréter l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH).

La FSH, de concert avec la testostérone (androgène principal sécrété par les testicules), stimule le processus de la spermatogénèse. Un des nombreux effets de la FSH sur les cellules de Sertoli est d'entraîner la libération de lactate (substrat préféré au glucose par les spermatocytes de 1er ordre) permettant de fournir l'énergie nécessaire aux cellules germinales en développement. La LH quant à elle agit sur les cellules de Leydig pour stimuler la biosynthèse de la testostérone (**Liu et Handelsman, 2003**).

Un schéma de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire est présenté à (**la figure 7**). La testostérone assure le maintien de la spermatogénèse via son action sur les cellules de Sertoli. La présence de récepteurs fonctionnels aux androgènes sur les cellules de la lignée germinale est encore aujourd'hui controversée. Cependant, certaines études ont démontré que l'expression de ces récepteurs est spécifique à l'état de développement des cellules germinales. Des techniques comme l'immunofluorescence ont permis de détecter la présence de récepteurs aux androgènes sur les spermatozoïdes humains, ce qui porte à croire que ceux-ci pourraient jouer un rôle tôt dans la spermatogénèse (**de Krester 2007**), (**Wang et al, 2009**). La testostérone exerce également un rôle dans la boucle de rétrocontrôle en inhibant la sécrétion de LH et de GnRH par l'hypophyse et l'hypothalamus respectivement. L'inhibine, une glycoprotéine sécrétée par les cellules de Sertoli, exerce un rétrocontrôle sur les cellules de l'hypophyse antérieure pour diminuer la sécrétion de la FSH (**Krester, 2007**).



**Figure 7** : Schéma des différentes composantes de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire (**Quang Nhuan, 2002**)

## II. INFERTILITE MASCULINE.

### Les différentes causes de l'infertilité masculine

#### II.1. Anomalies de l'éjaculation :

- **Impuissance ou échec à l'éjaculation**

L'impuissance, ou le dysfonctionnement érectile, est une incapacité d'avoir ou maintenir une érection assez longtemps pour permettre au rapport sexuel d'avoir lieu (**Godwin, 2004**).

- **Éjaculation prématurée**

Est caractérisé par l'incapacité du patient de contrôler la période de l'éjaculation d'une manière qui permet à son partenaire d'atteindre l'orgasme (**Nieschlag et al., 2010**).

- **Éjaculation rétrograde**

Les sphincters de la vessie sont fermés à l'heure de l'éjaculation empêchant de ce fait passage du sperme vers l'arrière dans la vessie. Les maladies telles que le diabète et la sclérose en plaques peuvent altérer la fermeture de ces sphincters menant à l'éjaculation rétrograde (**Godwin, 2004**).

- **Éjaculation extra-vaginale**

Le dépôt du sperme en dehors du vagin peut se produire non seulement dans les cas de l'éjaculation prématurée mais également chez les hommes qui ont des hypospadias ou des épispadias graves. Dans ce dernier cas l'ouverture de l'urètre n'est pas au bout du pénis mais plutôt quelque part le long de l'axe du pénis à cause de l'échec du développement du reste de l'urètre (**Godwin, 2004**).

#### II.2. Cause immunologique

Quand la barrière hémato-testiculaire est franchie, le système immunitaire produit des anticorps contre les spermatozoïdes (**Rizk et al., 2008**). C'est le cas après obstruction partielle ou complète des canaux de transport du sperme provoqué par une chirurgie : une vasectomie, traumatisme, infection des glandes accessoires, ou une épididymite (**Rizk et al., 2008**).

Des anticorps de la classe IgM sont produits juste après la rupture de la barrière hémato-testiculaire, mais généralement ceux-ci ne sont pas déversés dans l'éjaculat. Par la suite, les anticorps de la classe IgG apparaissent dans le sang et dans le plasma séminal, qui se fixent fortement aux spermatozoïdes. En cas d'infection ou d'inflammation de l'épididyme par exemple, les anticorps sécrétoires de la classe IgA sont produits (**Rizk et al., 2008**).

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 (**Rizk et al., 2008**).

La réaction immunitaire produit des espèces réactives oxygénées et l'agglutination de spermatozoïdes (**Rizk et al., 2008**).

#### II.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**). L'obstruction à l'écoulement des spermatozoïdes du testicule à l'extérieur a comme conséquence l'azoospermie. Une telle obstruction peut être provoquée par le blocage de l'épididyme ou l'absence congénitale des deux conduits déférents (**Godwin, 2004**).

L'infertilité masculine peut résulter des anomalies génétiques comme le syndrome de Klinefelter (homme avec XXY) ou autres rares anomalies chromosomiques (aneuploïdie ou translocations) ou de microdélétions du chromosome Y (**Forester et al., 2001**).



L'hypogonadisme hypogonadotrope congénital est associé avec l'anosmie dans le Kallmann, qui est habituellement détecté à l'âge de puberté (**Rizket *et al.*, 2008**).

#### **II.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 (Infection de Glandes Accessoires Masculines) 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**).

#### **II.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**), (**Erenpreiss *et al.*, 2002**); (**Fariello *et al.*, 2009**) ;(**Saleh *et al.*,2002**).L'augmentation de ROS séminal est associée avec la leucocytospermie et avec la réduction des concentrations des antioxydants (**Omu *et al.*, 1999**) ; (**Yadav *et al.*,2006**).

#### **II.6.Varicocèle**

La varicocèle résulte de la pression hydrostatique accrue dans le plexus pampiniforme intrascrotale et dans les veinules testiculaires (**Rizk *et al.*, 2008**).

Le mécanisme exact par lequel la varicocèle influence la fertilité reste peu clair. De diverses possibilités continuent à être discutées : la perfusion réduite du testicule affecté en raison de la pression veineuse accrue conduisant à une atrophie avec une réduction typique de volume testiculaire (**Nieschlag *et al.*, 2010**).

#### **II.7. Causes iatrogéniques**

- **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**).

- **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**).Les brûlures et le traumatisme crânien peuvent également causer la diminution de la production de spermatozoïdes (**Godwin, 2004**).

#### **II.8.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.

## II.9. Chimiothérapie

Ayant une action sur le cycle mitotique cellulaire, son retentissement 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**).

## II.10. 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 (**Magnusdottir et al., 2005**), (**Pauli et al., 2008**). En fécondation *In vitro* (FIV), on observe un impact négatif d'un indice de masse corporelle(BMI) élevé de l'homme (et de la femme) de façon combinée et de façon indépendante sur les taux de naissance (**Petersen et al., 2013**). Plus le BMI de l'homme est élevé et moins il y aurait de chances de grossesse en FIV (**Keltz et al., 2010**) L'impact négatif du BMI élevé de l'homme sur le taux de naissances vivantes en FIV ou ICSI serait associé à un taux de blastulation diminué (**Bakos et al., 2011**), (**Colaci et al., 2012**). Au niveau des gamètes, plus le BMI de l'homme augmente plus le risque de présenter une oligozoospermie ou une azoospermie est élevée. Il semble en être de même chez des hommes maigres (**Sermondade et al., 2012**).

Plus le BMI de l'homme est élevé et plus il y a un risque d'ADN(Acide désoxyribonucléique) spermatique fragmenté, élément associé à un risque accru de moindre fécondance et de fausse couche. L'obésité abdominale tend également à diminuer le nombre total de spermatozoïdes et leur mobilité (**Dupont et al., 2013**).

Ainsi, le BMI n'est pas le seul paramètre à évaluer : la masse grasse, le statut métabolique (lipidique, glucidique...) et l'alimentation doivent être prises en compte. L'alimentation (l'apport en antioxydants en particulier) peut modifier certains paramètres spermatiques. Un stress oxydatif accru peut occasionner des lésions susceptibles de diminuer leur pouvoir fécondant (**Young et al., 2008**), (**Schmid et al., 2013**).

Les antioxydants d'un régime peuvent agir soit directement comme des antioxydants soit comme des cofacteurs essentiels pour les systèmes des antioxydants enzymatiques SOD, CAT et Gpx. Le plasma séminale contient les deux antioxydants enzymatiques et les molécules de faible poids moléculaire non antioxydants enzymatiques tel que : l'acide ascorbique, L' $\alpha$ -tocophérol, l'acide urique, l'albumine, la carnitine (**Lanzafame et al., 2009**).

Une étude a été réalisée pour élucider l'association entre les apports alimentaires et les paramètres du sperme, et l'altération de l'ADN. Les hommes âgés (>44 ans) avec un meilleur apport de vitamine C, vitamine E et le zinc ont les taux les plus faibles de fragmentation d'ADN, des taux similaires à ceux des hommes plus jeunes (**Schimid et al., 2012**).

## II.11. Le tabagisme

Le tabac de la cigarette contient une forte concentration de ROS (les espèces réactives oxygénées) 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**).Le cadmium et le plomb sont dérivés de la cigarette et causent aussi les cassures de brin d'ADN (**Hengstler et al., 2003**) et sont présents dans le liquide séminale associés à l'indice de stress oxydatif(**kiziler et al.,2007**).La nicotine est oxydative et peut entraîner la cassure de

double brins d'ADN dans l'ADN spermatique *In vitro* (Arabi, 2004). La cotinine, est une métabolite majeur, elle est détectée dans le plasma séminal des fumeurs (Wong et al., 2000).

#### **II.12.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).

#### **II.13.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 (Mieuss et al., 1987).L'arrêt de la spermatogenèse augmente le nombre des spermatozoïdes immatures ou des spermatozoïdes (incomplètement matures) dans l'épididyme et l'éjaculat (Dada et al., 2003), et ce sont des sources majeures de ROS (Gil-Guzman et al., 2001),(Ollero et al., 2001).L'hyperthermie scrotale peut être le résultat des sous-vêtements très serrés(Southom, 2002).

#### **II. 14. 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. Le mot idiopathique est employé pour indiquer ces mauvais paramètres non expliqués (Godwin, 2004).

### III. ADN SPERMATIQUE

La reproduction chez les hommes est caractérisée en particulier par la production d'un grand nombre de spermatozoïdes par le processus de spermatogenèse dans laquelle la normalité phénotypique des gamètes et leur intégrité génomique peut être altérée (**Aitken et Krausz, 2001**). La formation des spermatozoïdes matures est un processus unique impliquant une série de méioses et mitoses, changement dans l'architecture cytoplasmique, le remplacement des histones somatiques par des protéines de transition et l'addition finale des protamines, menant à une chromatine fortement compactée (**Kumaroo et al., 1975**) ; (**Goldberg et al., 1977**) ; (**Poccia, 1986**).

#### III.1. Structure d'ADN

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

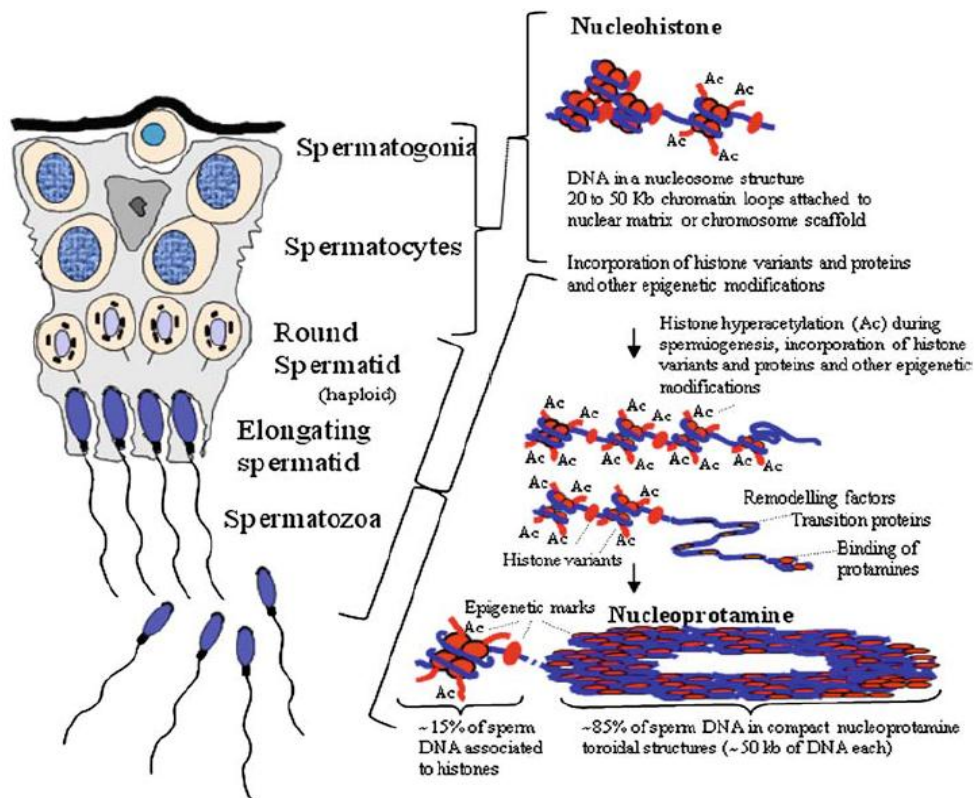
Elle est composée de 146 paires de bases d'ADN faisant 1.65 tour autour d'un octamère protéique comprenant deux exemplaires de chacune des histones H3, H4, H2A et H2B. L'ADN est maintenu par 116 liaisons hydrogène directes avec les histones localisées en 14 endroits distincts de la particule (**Luger et Richmond, 1998b**).

Les queues N terminales des histones, flexibles, ne sont pas définies dans la structure cristallographique, sauf celle de H4 qui établit une interaction avec un dimère H2A-H2B appartenant à un nucléosome voisin et se trouve ainsi stabilisée.

Ces queues portent de nombreux sites de modifications post-traductionnelles dont la combinatoire transmet d'importantes informations épigénétiques. (**Luger et Richmond, 1998a**).

#### III.2. Structure de la chromatine spermatique

La chromatine spermatique est organisée en une structure compacte et cristalline avec un ADN haploïde et des protéines hétérogènes, ce haut niveau de condensation et insolubilité joue un rôle protecteur durant le transport du matériel génétique masculin dans les voies génitales de l'homme et de la femme (**Tateno et al., 2000**). La condensation finale de l'ADN qui est six fois plus forte que dans le cas de chromosomes mitotiques des cellules somatiques. Les histones subissent une acétylation massive avant d'être remplacées par des petites protéines de transitions qui seront-elles-mêmes remplacées par des protamines (**Meistrich et al., 2003**) (**Figure 8**). Ce phénomène est nécessaire pour permettre au spermatozoïde d'être le plus mobile possible et implique que la cellule puisse temporairement fonctionner sans l'ADN nucléaire (**Kimura et Yanagimachi, 1995**) ; (**Ogura et al., 1994**).



**Figure 8:** schéma représentatif des changements cellulaires et chromatiques majeurs qui se produisent durant la spermatogénèse (Cheung *et al.*, 2009)

Cette condensation est assurée juste pour la fécondation et non durant le développement embryonnaire. Il est important de comprendre le mécanisme de compaction d'ADN spermatique et la différence par rapport aux cellules somatiques ; la compaction se passe par 4 niveaux (Hud *et al.*, 1993, 1994) ;(Brewer *et al.*, 1999, 2003), (Vilfan *et al.*, 2004) :

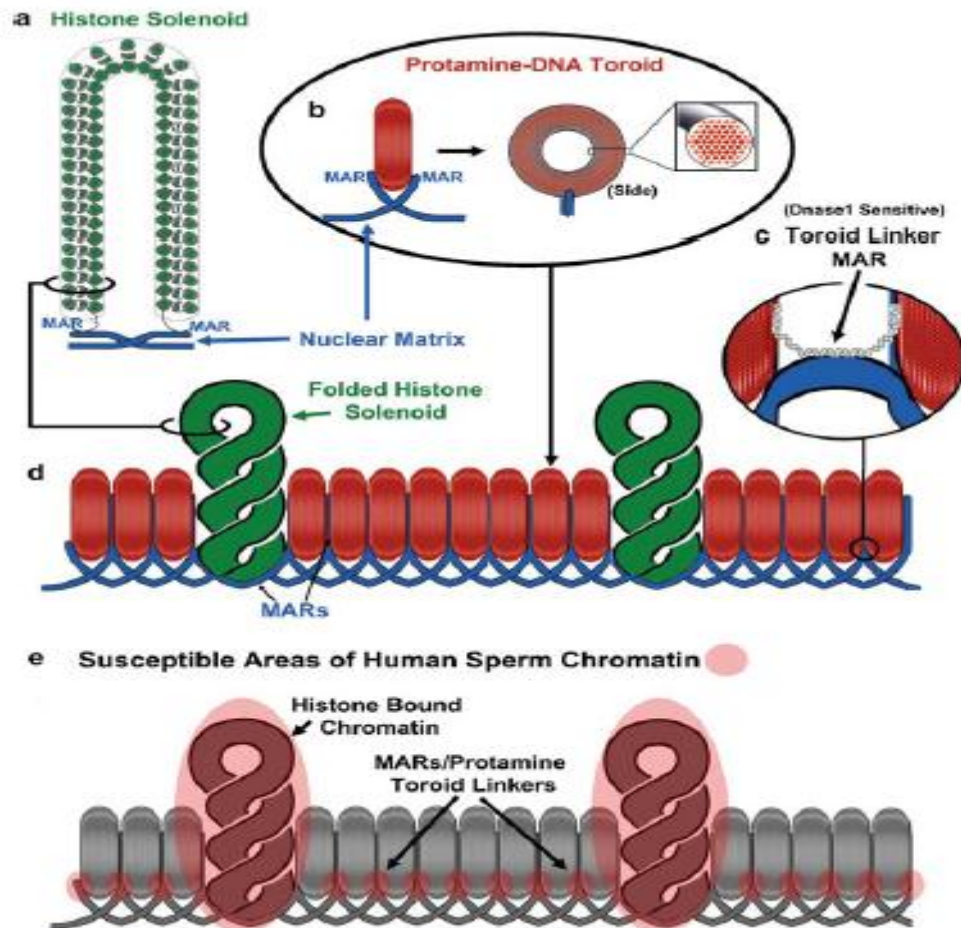
Protamines binding L'unité fondamentale de compaction d'ADN spermatique chez les mammifères est le toroïde (Figure 9).La fixation de protamines neutralise la charge négative de la double hélice ADN. La protamine contient les cystéines qui favorisent la stabilité de la chromatine spermatique (Balhorn, 1982); (Prieto *et al.*, 1997).

La rétention de 15% d'histones induit une formation moins compactée, contrairement aux autres mammifères où les spermatozoïdes contiennent 1 type de protamine (p1), chez l'Homme et la souris il existe un 2ème type de protamine (p2) qui est déficient en résidus cystéines. L'altération du ratio p1/p2 ou l'absence du p2 est associée à des problèmes de fertilité (Corzett *et al.*, 2002).

L'attachement des protamines à l'ADN conduit à moins surenroulement par rapport aux histones. L'histone enroule l'ADN chaque 100pb mais les protamines chaque 600pb ou plus donc plus de compaction mais moins enroulé (Ward, 1993) ;(Ward *et al.*, 1989).

La position et le rôle de ce résidu d'histones reste controversé, certains auteurs démontrent une localisation dans les télomères (Gineitis *et al.*, 2000), (Zalensky *et al.*, 2002), d'autres suggèrent le site de boucle ADN (Pittoggi *et al.*, 2000), (Wykes et Krowetz, 2003).Cependant, la chromatine spermatique reliée à l'histone reste candidate pour le dommage d'ADN.

Grâce aux complexes ATP-dépendant de remodelage et aux domaines de reconnaissances, la chromatine est capable de recruter de façon spatio-temporelle précise, 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 retrait des facteurs de remodelage ATP-dépendant (Peterson, 2000).



**Figure 9:**Un modèle de la structure de la chromatine spermatique chez l'Homme (Ward, 2010).

- **Le rôle de la condensation de la chromatine spermatique :**

La condensation de la chromatine spermatique Permet le transfert total de l'information génétique étroitement compactée à l'œuf (Sakkas *et al.*, 1999).

Elle Assure que l'ADN soit livré sous une forme physique et chimique tel que l'embryon en développement peut accéder à l'information génétique (Sakkas *et al.*, 1999).

Cette condensation nucléaire protège le génome spermatique contre :

- ❖ Les stress externes tels que l'oxydation ou l'élévation de température qui peut être produite dans le trajet des spermatozoïdes dans les voies génitales masculines et féminines (Kosower *et al.*, 1992).
- ❖ Les nucléases (Sotolongo *et al.*, 2003) et la sonication (Tateno *et al.*, 2000).

On estime que 85% de la chromatine spermatique soit étroitement condensée par des protamines, mais jusqu'à 15% du reste de l'ADN est empaqueté par des histones liées aux séquences d'ADN spécifiques à la périphérie nucléaire et à des télomères (Gatewood *et al.*, 1987) ;(Gineitiset *al.*, 2000).

### **III.3. La relation entre la structure chromatique et l'altération d'ADN chez les spermatozoïdes des mammifères**

L'emballage de la plupart de la chromatine spermatique à un état presque cristallin, donnant l'impression que toutes les activités normales de la chromatine vont être exclues par cette transcription silencieuse de la non répliation cellulaire. Cependant, des études récentes suggèrent que la modification de la machinerie enzymatique d'ADN reste toujours active, le H2AX peut être phosphorylé à une gamma-H2AX suite à une réponse des agents mutagènes ou à un traitement peroxyde (**Berling et Wolner hansen, 1997**), (**Carlsen et al., 1992**). Comme **Aitken et Iuliis** ont noté, que la transcription et la traduction silencieuse des spermatozoïdes avec une telle compaction étroite, l'épuisement des histones chromatique, possèdent la capacité de détecter les traces des cassures des brins d'ADN pour la réparation par la phosphorylation H2AX est fascinant et mérite une attention particulière. La chromatine avec ce type de cellule est inerte mais une fois endommagée, il va falloir attendre jusqu'à la fécondation pour que la réparation soit mise en place par l'embryon pendant la période post-fécondation de la réparation d'ADN qui implique l'activation de la voie de signalisation de gamma H2AX (**Templeton, 1995**).

### **III.4. 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 protecteurs des télomères. Les télomères constituent une sorte de marqueur pour l'âge biologique. Un nombre insuffisant de télomère répété induit à l'altération chromosomique, la sénescence cellulaire, et la mort.

Dans le spermatozoïde différencié, les télomères sont attachés à la membrane nucléaire où ils jouent un rôle fondamentale dans l'organisation du noyau du spermatozoïde (**Moskovtsev et al., 2010**).

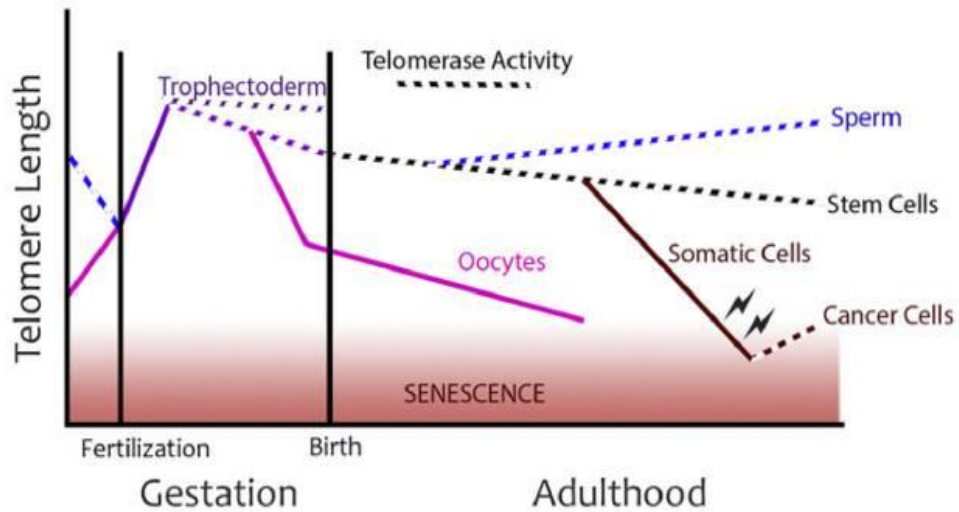
Après la fécondation, les télomères spermatiques sont le premier site dans le génome spermatique à répondre au signal de l'ovocyte pour la formation de pro-noyau et le mouvement guidé des microtubules (**Thilagavathi et al., 2012**).

L'importance des télomères pendant la fécondation a été démontrée dans la télomérase des souris knockout, qui expose significativement des télomères réduits ainsi que l'interruption de la fonction reproductive chez les deux sexes (**Lee et al, 1998**), (**Ioannou et Griffin, 2011**).

Contrairement à la longueur des télomères dans les ovocytes, qui diminue avec l'âge de la femelle, la longueur des télomères spermatiques augmente avec l'âge (**Kimura et al., 2008**), (**Gibbons, 2012**), (**Prescott 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 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.

La compromission de la longueur des télomères spermatique, peut contribuer à la ségrégation des erreurs, l'apoptose qui réduit le nombre des spermatozoïdes, et réduit la fertilité. (**Santiso et al., 2010**), (**Baird et al., 2006**).



**Figure 10:** Schéma représentatif de la relation entre la longueur des télomères et le développement chez les mammifères (Kalmbach. *Telomeres and human reproduction*. FertilSteril 2013).

### III.5. Fragmentation de l'ADN spermatique

La fragmentation de l'ADN fait référence à des ruptures et des lésions dans le matériel génétique du spermatozoïde, particulièrement fréquentes dans la population masculine sub-fertile (Irvine *et al*, 2000) elle ne constitue pas une mutation mais est un changement pro-mutagène qui peut générer des mutations chez la descendance suite à une réparation inadéquate ou défectueuse. L'impact de la fragmentation d'ADN spermatique est principalement sur les grossesses et fausses couches, peu au niveau du développement embryonnaire précoce, y compris la fécondation.

#### III.5.1. Fragmentation d'ADN pendant la spermiogénèse

Les brèches endogènes de l'ADN sont présentes normalement dans des étapes spécifiques de la spermiogénèse chez les rats et les souris, et on pense qu'ils ont une signification fonctionnelle (Sakkas *et al.*, 1999). La présence des brèches est plus importante pendant la transition de spermatides rondes vers des spermatides ovales dans le testicule et se produit avant l'accomplissement de la protamination dans les spermatozoïdes en maturation chez les rats et les souris (McPherson et Longo, 1992), (Sakkas *et al.*, 1995).

McPherson et Longo (1992, 1993a, b) ont postulé que la présence des brèches d'ADN dans les spermatozoïdes éjaculés peut être indicative d'une maturation inachevée pendant la spermiogénèse. Ils ont supposé que la condensation de chromatine peut nécessiter l'activité nucléase endogène pour créer et ligaturer les brèches qui facilitent la protamination. On pense que ces brèches fournissent une forme de détorsion pour faciliter l'arrangement de chromatine pendant le déplacement des histones par les protamines et on pense que c'est le même procédé qui se produit chez l'homme (Marcon et Boissonneault, 2004). L'activité enzymatique impliquée dans la création des coupures d'ADN dans les spermatides a été seulement prouvée



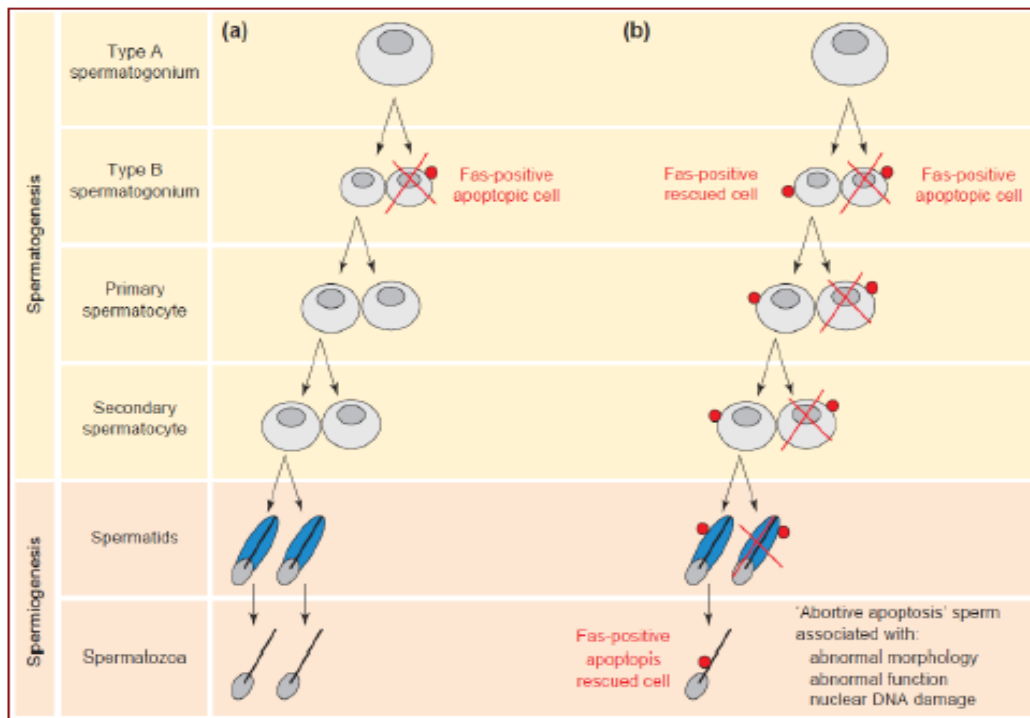
pour la topoisomérase II qui produit et ligature les fragments double brins (McPherson *et Longo*, 1993);(Laberge et Boissonneault, 2005).

### III.5.2. Les différentes causes de fragmentation d'ADN spermatique

- **Apoptose cellulaire**

L'apoptose joue un rôle crucial durant la vie de cellules germinales, durant le développement précoce le processus apoptotique assure un optimal ratio cellules Sertoli /cellules germinales. Cette régulation est similaire à la différenciation des gonades chez la femme. A la vie adulte l'apoptose joue aussi un rôle significatif par l'élimination sélective de différentes cellules germinales endommagées (Aiken *et al.*, 2011)

Ce processus survient le plus souvent en stade pachytène au niveau des spermatocytes, le système Fas/FasL étant le majeur médiateur (Lin *et al.*, 2010) Fas est une protéine de surface membranaire de type I qui appartient à la famille de *tumournecrosis factor*, et elle est impliquée dans l'apoptose (Suda *et al.*,1993) ; (Krammer *et al.*,1994) ; (Schulze-Osthoff *et al.*,1994).



**Figure 11** : 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 du ligand de Fas (FasL) ou d'un anticorps agonistique anti-Fas à cette molécule de surface tue les cellules par apoptose (Suda *et al.*, 1993). Il a été montré chez les souris et les rats qu'en état normal, les cellules de Sertoli expriment les FasL et signalent la destruction des cellules germinales Fas-positives, limitant la taille de la population de cellules germinales aux nombres qu'elles peuvent soutenir (Lee *et al.*, 1997) ; (Rodriguez *et al.*, 1997).

Cependant, pourquoi les spermatozoïdes éjaculés montrent-ils ces dispositifs apoptotiques tandis qu'ils devraient être éliminés ? On a suggéré que la clairance correcte des spermatozoïdes par l'intermédiaire de l'apoptose ne se produit pas. Les spermatozoïdes Fas-positifs peuvent également se produire en raison des problèmes d'activation de l'apoptose Fas médiée. Ces problèmes peuvent être dus à un défaut de synchronisation entre l'apoptose et la spermatogenèse, dans ce cas, quoique l'apoptose soit initiée, les cellules germinales atteignent la spermiogénèse et n'accompliront pas l'apoptose (**Sakkas et al., 1999**).

La deuxième théorie propose que la présence des brèches endogènes dans les spermatozoïdes humains éjaculés soit une caractéristique de la mort cellulaire programmée, comme le cas de l'apoptose des cellules somatiques, et l'élimination fonctionnelle des cellules germinales ayant probablement un pool génétique défectueux (**Gorczyca et al., 1993a, b**). L'apoptose des cellules germinales testiculaires se produit normalement durant toute la vie, contrôlant leur surprolifération (**Billig et al., 1995**) ; (**Rodriguez et al., 1997**). Ce mécanisme régule le nombre de cellules germinales par rapport à la capacité de support des cellules de Sertoli (**Sakkas et al., 1999**). Les cellules germinales masculines se transformant en spermatozoïdes hautement différenciés, perdent progressivement leur capacité de subir l'apoptose (**Barratt et al., 2010**).

Ainsi, au lieu de s'engager dans une réponse apoptotique complète menant à la mort cellulaire, on pense que les cellules germinales haploïdes en différenciation subissent une forme restreinte de ce processus conduisant à la fragmentation d'ADN dans le noyau tandis qu'elles maintiennent la capacité de se différencier en spermatozoïdes matures fonctionnels (**Sakkas et al., 2004**).

- **Fragmentation de l'ADN spermatique post-testiculaire**

Une caractéristique importante qui a été révélée à partir des études récentes est que généralement le degré de fragmentation d'ADN dans les spermatozoïdes éjaculés est plus élevé que dans les spermatozoïdes testiculaires (**Steele et al., 1995**); (**Greco et al., 2005**) et dans les spermatozoïdes du corps et de la tête de l'épididyme, où précisément le processus d'établissement des liaisons disulfure a lieu, et que l'induction de la fragmentation d'ADNs spermatique dans l'épididyme pourrait être liée à leur qualité génomique (**Sakkas et al., 2010**). C'est-à-dire, en plus du mécanisme de tri exercé par les cellules de Sertoli pendant la spermatogenèse, il y aurait un autre mécanisme de criblage au niveau de l'épididyme qui sert à éliminer les spermatozoïdes ayant un génome défectueux (**Suganuma et al., 2005**).

Les dommages potentiels que les spermatozoïdes peuvent subir pendant le passage dans l'épididyme pourraient être limités en les retirant avant ce passage (**Sakkas et Alvarez, 2010**).

- **Stress oxydatif**

Les espèces réactives oxygénées (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) jouent un rôle physiologique important en modulant les activités des gènes et des protéines essentielles pour la prolifération, la différenciation et la fonction des spermatozoïdes. Dans le sperme des hommes fertiles la quantité de ROS générées est convenablement contrôlée par les antioxydants qui se trouvent dans le sperme. Les effets pathogènes des ROS se produisent quand ils sont produits au-dessus des capacités des antioxydants de l'appareil génital masculin ou du plasma séminal (**Aitken et al., 1992**).

30 à 80 % des causes de subfertilité masculine sont dues à des dommages causés par stress oxydatifs (**Cochrane, 2015**).

Le plasma séminal est riche en antioxydants qui protègent et nourrissent les spermatozoïdes.

La membrane plasmique des spermatozoïdes est riche en acide gras polyinsaturé et susceptible aux dommages oxydatifs (**Palermo et al., 2014**).

Les études récentes montrent que les spermatozoïdes non matures, qui subissent des niveaux élevés de ROS, peuvent induire des endommagements d'ADN dans les spermatozoïdes matures. Ces dommages seraient produits après spermiation pendant la comigration des spermatozoïdes matures et non matures à partir des tubules séminifères vers la partie caudale de l'épididyme (**Ollero et al., 2001**). Les ROS peuvent endommager l'ADN spermatiques directement ou indirectement par l'activation des caspases et des endonucléases spermatiques, (**Sakkas et Alvarez, 2010**).

A des niveaux élevés, les ROS sont impliqués dans les 3 sources de structure anormale de la chromatine : activité anormale de topo II, apoptose, et nécrose (**Evenson et al., 2002**).

Les spermatozoïdes morphologiquement anormaux (en particulier avec le résidu cytoplasmique) et les leucocytes sont la source principale de génération excessive de ROS dans le sperme (**Aitken et al., 1992**).

La production de ROS peut être augmentée 20-50 fois pendant des étapes répétées de centrifugation,

(**Aitken et Clarkson, 1988**) ; (**Zalata et al., 1995**). En outre, la préparation de sperme pour la PMA pourrait mener à la production non réglée de ROS quand des spermatozoïdes sont séparés du plasma séminal, éliminant de ce fait la protection antioxydante du plasma séminal accordée par la superoxydedismutase, la catalase, et la peroxydase de glutathion/réductase (**Griveau et Le Lannou, 1997**).

- **Fragmentation d'ADN induite par Chimiothérapie et radiothérapie**

Il a été déjà signalé que l'exposition à la chimiothérapie et à la radiothérapie peut également avoir comme conséquence l'induction de la fragmentation d'ADN spermatique.

On sait généralement que les traitements contre le cancer compromettent la fertilité masculine et que la réduction du rendement des spermatozoïdes résulte des effets cytotoxiques de la chimiothérapie ou de la radiothérapie sur l'épithélium spermatogénique (**Morris et al., 2002b**).

- **Les endommagements d'ADN induits par les toxines environnementales**

Au moins cinq types de produits chimiques environnementaux, connus comme ubiquitaires dans l'environnement d'aujourd'hui, peuvent être associés au stress oxydant au niveau des spermatozoïdes ou aux endommagements d'ADN spermatiques (**Barratt et al., 2010**).

- **Les pesticides**

L'impact des pesticides sur des endommagements d'ADN spermatique a été évalué dans au moins sept études dans les 15 dernières années, dont quatre ont reporté des associations positives (**Perry et al., 2008**).

- **Les phtalates**

Les esters de phtalate sont employés dans l'emballage des aliments et dans les produits de soin personnel et en plastique (**Barratt et al., 2010**).

Dans un groupe de 379 hommes des couples subfertiles qui sont présentés dans des cliniques d'infertilité, des niveaux urinaires de deux métabolites spécifiques de phtalate : le phtalate mono-éthylrique et le mono (2-éthylhexyl) phtalate ont été associés à un pourcentage élevé d'ADN avec la queue de comète en utilisant le test neutre de COMETE (**Hauser et al., 2007**).

- **Les polychlorobiphényles**

Les Polychlorobiphényles (PCBs) constituent une classe des polluants organiques persistants (**Barratt *et al.*, 2010**). Les impacts des PCBs sur l'intégrité d'ADN spermatique en utilisant le SCSA (SpermChromatin Structure Assay, voir ci-dessous) ont été récemment démontrés dans des études épidémiologiques des populations d'Europe et d'Inuit (**Spano *et al.*, 2005 ; Long *et al.*, 2007**) et chez les pêcheurs suédois (**Rignell-Hydbom *et al.*, 2005**).

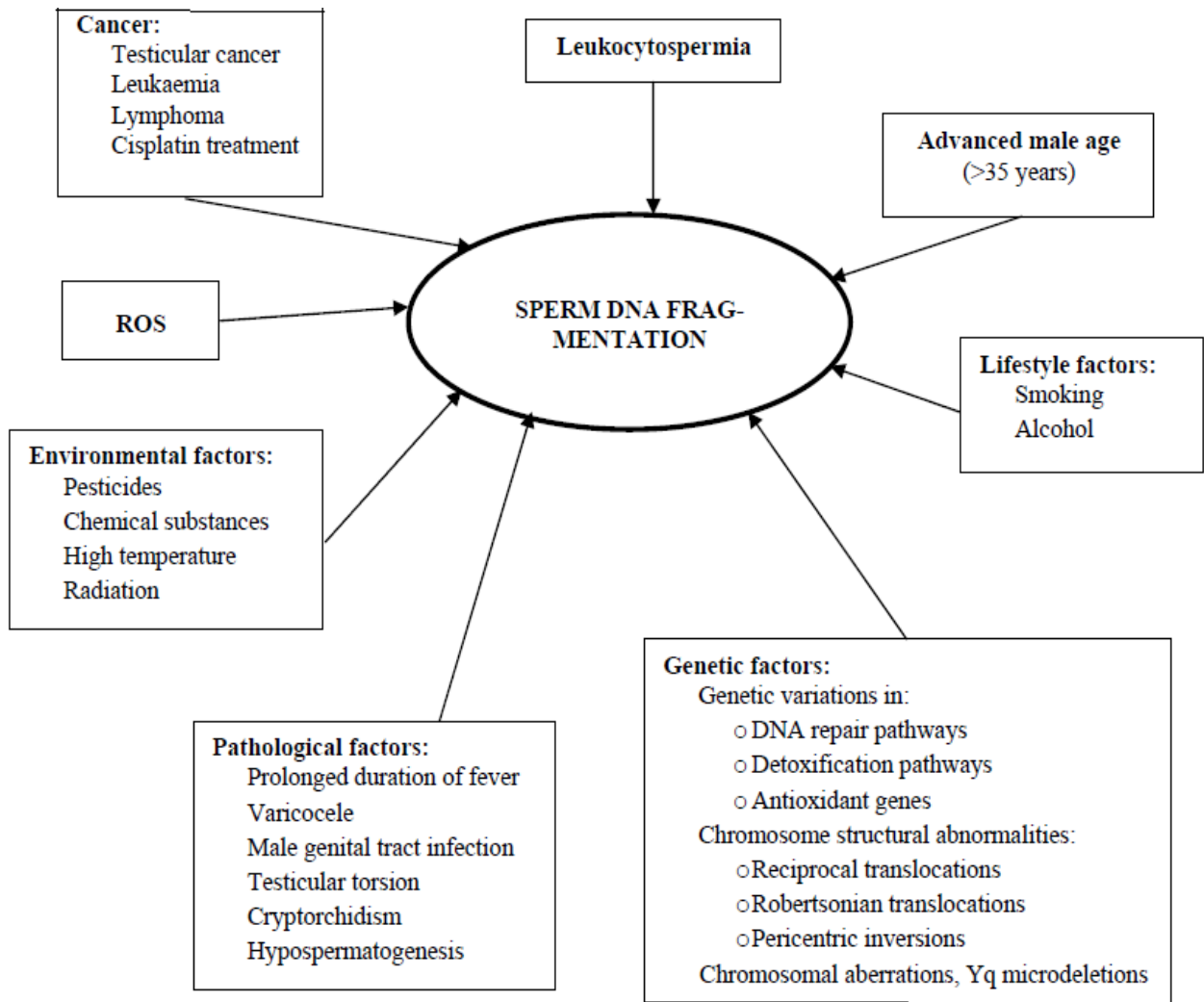
- **Les métaux**

Deux études épidémiologiques ont suggéré que les métaux non essentiels puissent endommager l'ADN spermatique (**Barratt *et al.*, 2010**). Des endommagements d'ADN spermatique causés par le stress oxydant mesurés par 8OHdG3 ont été corrélés avec le cadmium dans le plasma séminal chez 56 participants non-fumeurs dans une étude faite en Chine (**Xu *et al.*, 2003**).

- **La pollution atmosphérique**

Des niveaux élevés de la pollution atmosphérique résultant de la combustion de charbon ont été associés à la fragmentation accrue d'ADN spermatique mesurée par SCSA dans une étude longitudinale englobant 36 hommes de la République Tchèque (**Rubes *et al.*, 2005**).

(**Rubes *et al.*, 2007**) ont prolongé ces observations et ont adressé l'hypothèse que les hommes qui sont homozygotes nulles pour la glutathion-S-transférase M1 peuvent moins détoxifier les métabolites réactifs des hydrocarbures aromatiques polycycliques cancérigènes trouvés dans la pollution atmosphérique. En conséquence, ces hommes sont plus prédisposés aux effets de la pollution atmosphérique sur la chromatine spermatique.



**Figure 12 :** Les facteurs majeurs de fragmentation d'ADN spermatique (Shamsi *et al.*, 2012).

### III.6. Les différents tests de fragmentation d'ADN spermatique

Pendant les dernières deux décennies un certain nombre de tests ont été introduits pour l'analyse de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes essentiellement pour la PMA.

Ces tests incluent le TUNEL (Gorczyca *et al.*, 1993a), le test de COMETE (Hughes *et al.*, 1996) CMA3 (Manicardi *et al.*, 1995), in-situ nick translation (Bianchi *et al.*, 1993); (Tomlinson *et al.*, 2001), test de dispersion de chromatine spermatique (SCD) (Fernandez *et al.*, 2003), et Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) (Evenson *et al.*, 1980a, b); (Larson *et al.*, 2000); (Evenson *et al.*, 2002).

Un aspect important dans l'analyse de fragmentation d'ADN des spermatozoïdes est la question liée au type de cassures d'ADN produites dans les brins d'ADN, c'est-à-dire si les cassures sont simples ou double brins et si elles exigent une première étape de dénaturation afin de détecter les cassures d'ADN (Sakkas et Alvarez, 2010).

- **Analyse de la structure de la chromatine des spermatozoïdes (Sperm Chromatin Structure Assay – SCSA)**

Le SCSA, technique développée par (Evenson *et al.*, 1980) tente d'établir une relation entre la structure de la chromatine et sa fonction. Cette approche définit une chromatine anormale comme celle qui a une plus grande susceptibilité à se dénaturer in situ en milieu acide. Ainsi, la résistance de la chromatine des spermatozoïdes à se dénaturer en milieu acide est mesurée en exposant les spermatozoïdes à un pH de 1,2, suivi d'une coloration à l'acridine orange

(AO) avant l'analyse en cytométrie de flux. La coloration différentielle des spermatozoïdes avec l'ADN natif versus l'ADN dénaturé est due aux propriétés métachromatiques de l'acridine orange : lorsqu'elle s'intercale dans l'ADN natif et bicaténaire (double-brin) (**Sergrie et al., 2005**).

- **Évaluation de la chromatine par la chromomycine A3 (CMA3)**

Des corrélations ont été retrouvées entre des anomalies de la condensation de la chromatine et l'accessibilité de l'ADN à la chromomycine A3 (**Roux et al., 2004**).

La liaison à l'ADN est compétitive avec les protamines, et la fluorescence de CMA3 a été donc interprétée comme preuve d'une faible protamination (**Bianchi et al., 1993**). Elle révèle une déficience locale de la chromatine en nucléoprotéines définitives et des zones d'ADN dénaturé ou fragmenté. Un sperme peut être considéré comme normal quand il possède moins de 30% de spermatozoïdes positifs au test à la CMA et nécessite un microscope à fluorescence (**Roux et al., 2004**).

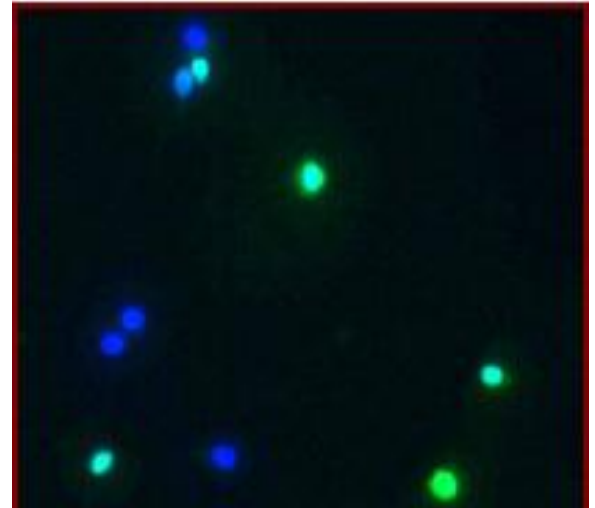
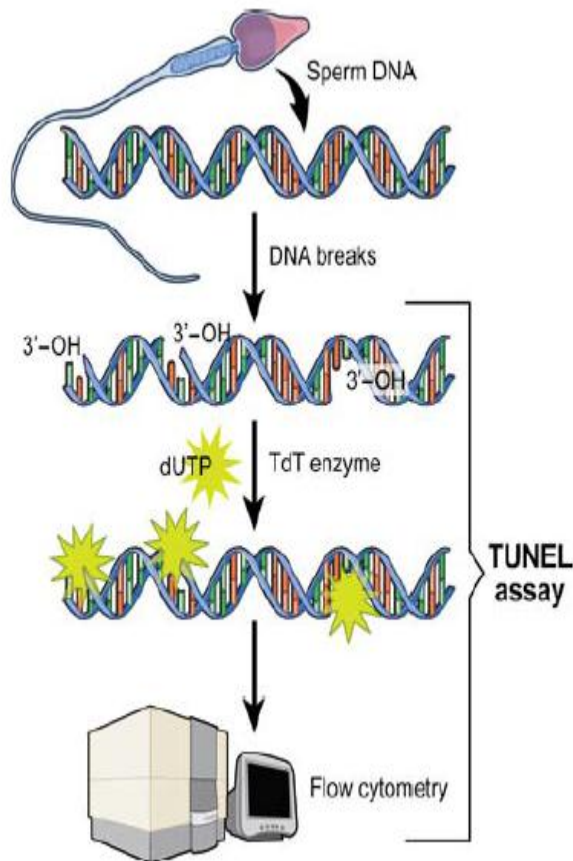
- **Test in situ de cassures dans l'ADN (In situ Nick Translation Assay – NT)**

Le test in situ de cassures dans l'ADN mesure l'incorporation du complexe biotine–dUTP aux cassures simple-brin de l'ADN en utilisant l'activité de l'enzyme ADN polymérase I.

Dans une étape préalable, les spermatozoïdes sont traités par le dithiothréitol (DTT) pour décondenser la chromatine. Le DTT réduit les ponts disulfures intra et intermoléculaires de la chromatine, relâchant ainsi sa structure fortement condensée et permettant à l'enzyme et aux nucléotides d'accéder plus facilement aux cassures de l'ADN, améliorant donc la sensibilité de la méthode (**Sergrie et al., 2005**).

- **Marquage des brins d'ADN avec la terminale désoxynucléotidyle transférase (Terminal Uridine Nick-End labeling – TUNEL)**

Lors de la fragmentation de l'ADN, des groupements terminaux 3'-OH sont générés et deviennent donc facilement identifiables. Une des techniques utilise l'activité spécifique de la terminale désoxynucléotidyle transférase (TdT) pour incorporer un complexe biotine désoxyuridine (pour *Terminal Uridine Nick-End labeling*– TUNEL) à la portion 3'-OH terminale d'un brin d'ADN. Un signal est obtenu par l'addition de streptavidine couplée à la fluorescéine (**Sergrie et al., 2005**). L'analyse TUNEL mesure l'incorporation du dUTP au niveau des cassures d'ADN simple et double brin (**Evenson et al., 2002**).



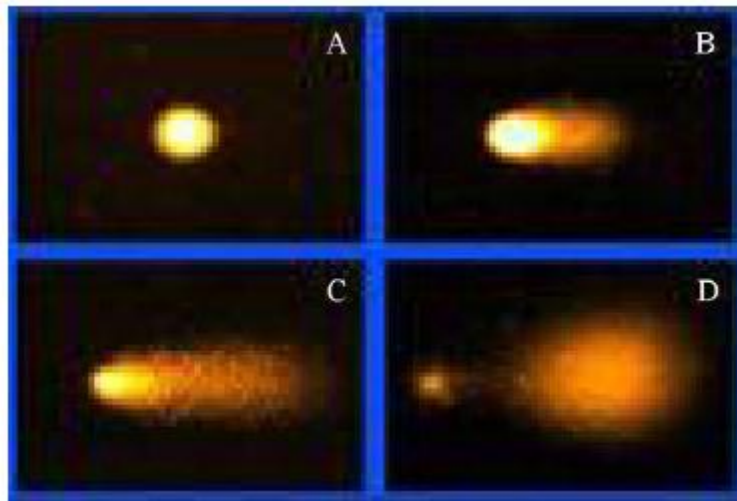
**Figure 13:** schéma de la technique TUNEL assay spermatozoïdes normaux (TUNEL négatif) en couleur Bleue. En couleur verte : les spermatozoïdes avec fragmentation d'ADN (TUNEL positif) (Hazout *et al.*, 2008).

Les spermatozoïdes avec une chromatine normale ne présentent qu'une très faible fluorescence à l'inverse des spermatozoïdes avec un ADN fragmenté. La détection de la fragmentation de l'ADN peut être obtenue avec seulement un à deux millions de spermatozoïdes en cytométrie de flux. (Sergrie *et al.*, 2005).

L'analyse microscopique TUNEL a été modifiée par quelques chercheurs pour inclure un système de marquage par des enzymes peroxydases qui produit catalytiquement un signal intense à partir des substrats chromogènes (Evenson *et al.*, 2002).

- **Analyse unicellulaire sur gel d'électrophorèse (Single Cell Gel Electrophoresis Assay – COMET)**

Elle a été affinée pour mesurer les dommages d'ADN d'un spermatozoïde, en observant la migration des fragments d'ADN sur microgel d'agarose lors de l'électrophorèse (Sergrie *et al.*, 2005). Les cellules sont traitées pour détruire les membranes plasmiques et nucléaires et digérer les protéines (Hazout *et al.*, 2008). Les spermatozoïdes inclus dans une mince couche de gel d'agarose sur lame de microscope sont lysés, exposés à un courant électrique, puis colorés avec un fluorochrome spécifique à l'ADN. Les cassures dans l'ADN libèrent les super-enroulements de la chromatine et permettent la migration de l'ADN vers l'anode ; la coloration révèle une distribution dans le gel rappelant l'aspect d'une comète montrée dans la figure 11 (d'où l'appellation COMET assay) (Sergrie *et al.*, 2005).



**Figure 14.** Test Comète. A et B : sperme normal ; C et D : sperme fragmenté (image en « poussière d'étoile ») (Hazout *et al.*, 2008).

Un spermatozoïde avec un niveau élevé de fragmentation de l'ADN aura une forte intensité de fluorescence dans la queue de la comète avec un allongement de cette partie (Sergie *et al.*, 2005).

- **Tests de dispersion de la chromatine spermatique SCD**

Le test de SCD est basé sur le principe du fait que les spermatozoïdes avec un ADN fragmenté échouent à produire le halo caractéristique des boucles d'ADN dispersées, qui est observé dans les spermatozoïdes avec un ADN non fragmenté, après dénaturation acide et déplacement des protéines nucléaires. Les halos correspondent aux boucles d'ADN détendu attachées à la structure nucléaire résiduelle (Fernandez *et al.*, 2003). Les noyaux déprotéinisés s'appellent « les nucléotides ». La présence des cassures d'ADN favorise l'expansion du halo du nucleoïde et c'est la base du test de halo pour détecter les endommagements d'ADN (Roti *et Wright*, 1987) ;(Smith *et Sykes*, 1992).

Quand les noyaux de spermatozoïdes contiennent l'ADN fragmenté, la solution dénaturante transforme les régions contenant des cassures étendues d'ADN en motifs d'ADNsb (Gorczyca *et al.*, 1993a, b). Dans les noyaux de spermatozoïdes sans ADN fragmenté, la solution acide légère ne produit pas d'ADNsb. Les spermatozoïdes avec ADNdb reflètent des spermatozoïdes à un ADN intacte, et les spermatozoïdes avec un ADNsb sont indicatifs des spermatozoïdes à ADN fragmenté (Fernandez *et al.*, 2003). Les cellules sont marquées avec DAPI (49,6-diamidino-2-phenylindole) pour la microscopie à fluorescence ou colorées avec le réactif de Diff-Quik pour la microscopie à fond clair (Fernandez *et al.*, 2003).



**Tableau I:** Avantages et inconvénients des tests SCD, TUNEL et SCSA (Zini *et al.*, 2009).

<b>Techniques</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>SCD</b>	<p>1-Méthode rapide basée sur le contrôle de la dénaturation d'ADN et la déplétion des protéines pour déterminer la fragmentation d'ADN spermatique.</p> <p>2-Une technique qui peut être directement validée par d'autres techniques ayant travaillé sur le même ADN spermatique.</p> <p>3-Rapide, microscopie à fond clair.</p>	<p>1-Nombre limité de données cliniques.</p> <p>2-Manque de valeurs seuils précises.</p>
<b>TUNEL</b>	<p>1-peut être exécutée sur une petite quantité de spermatozoïdes.</p> <p>2-Simple et rapide.</p> <p>3- Haute sensibilité.</p> <p>4-Corrélée avec les paramètres spermatiques.</p> <p>5-Les réactifs sont disponibles sur le marché.</p>	<p>1-Équipement cher non requis (microscope à fluorescence ou cytométrie en flux).</p> <p>2-Technique qui est surtout utilisée pour l'ADN des cellules somatiques où la chromatine est arrangée avec les histones. Mais à cause de la condensation de la chromatine (hautement protégée) des spermatozoïdes, l'efficacité de cette technique est limitée par l'accès difficile de l'enzyme TDT aux extrémités 3'OH libres de l'ADN fragmenté.</p> <p>3- Non spécifique aux endommagements oxydatifs.</p>
<b>SCSA(Sperm ChromatinStructure Assay)</b>	<p>1-De nombreuses cellules sont rapidement examinées.</p> <p>2-La plupart des études publiées sont reproductibles.</p>	<p>1-Equipements requis coûteux.</p> <p>2-Des variations faibles des conditions de laboratoire influant les résultats et induit une décision qualitative.</p>

## IV. LES TECHNIQUES DE PMA

Beaucoup de cas d'infertilité peuvent être traités par des méthodes qui ont été développées pour aider les couples qui en souffrent: il s'agit des méthodes de procréation médicalement assistée (PMA). Ces dernières peuvent consister en:

- **L'insémination intra-utérine:** le sperme est recueilli par masturbation, est introduit par cathéter dans l'utérus de la femme dont les ovaires ont été stimulés pour provoquer une ovulation.
- **La fécondation *In vitro* classique (FIV):** le sperme et les ovocytes sont en contact à l'extérieur du corps de la femme pour permettre à la fécondation d'avoir lieu, l'ovule fécondé est ensuite réintroduit dans l'utérus de la femme.
- **L'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI):** L'ICSI est l'une des techniques de fécondation *In vitro* consiste en une injection directe d'un spermatozoïde dans l'ovocyte. (Devroey *et al.*, 2004). Le premier rapport d'une grossesse avec ICSI (Palermo *et al.*, 1992).

### IV.1. Stimulation ovarienne

Après un protocole de stimulation ovarienne long, semi-long ou court selon le profil ovarien (avec désensibilisation de l'antéhypophyse par des agonistes ou antagonistes, ou sans analogue GnRH, stimulation ovarienne par FSH et/ou HMG, induction ovulatoire par HCG), un nombre d'ovocytes matures est généralement obtenu dans les conditions optimales (Branco *et al.*, 2006)

### IV.2. Recueil et sélection des spermatozoïdes

Le recueil des spermatozoïdes peut se faire à partir d'un éjaculat après masturbation, ou par prélèvement chirurgical à partir de l'épididyme (TESA : Testicular Sperm Aspiration) ou les testicules (TESE : Testicular Sperm Extraction).

De manière générale il est préférable d'utiliser les spermatozoïdes issus du sperme éjaculé différentiels, épидидymaires et enfin testiculaires (Andersen *et al.*, 2005)

La sélection du spermatozoïde à micro-injecter est basée sur des critères de morphologie (critères de Kruger ou de David) et mobilité (Who, 1999).

### IV.3. Ponction et recueil folliculaire

Une ponction écho-guidée transvaginale sous anesthésie générale ou locale est effectuée pour aspirer les follicules à l'aide d'une aiguille dans les deux ovaires. Chaque tube de fluide aspiré est examiné pour identifier les follicules qui sont alors lavés dans un milieu de culture et misent dans un incubateur 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> (Godwin, 2004).

### IV.4. Micro-injection

Cette étape représente l'acte d'injection intracytoplasmique du sperme correspondant au nom de la technique (ICSI) qui consiste à :

- Réaliser une décoronisation de l'ovocyte par digestion enzymatique rapide dans son milieu de culture, par la hyaluronidase suivie de rinçages.
- Réaliser une micro-injection : Aspirer le spermatozoïde, la queue en premier, avec la pipette de micro injection. Les mouvements des spermatozoïdes sont ralentis par

l'utilisation de polyvinylpyrrolidone (PVP) ou hyaluronate et immobiliser le spermatozoïde par effet de cisaillement du flagelle.

- Maintenir l'ovocyte par la pipette de contention, et l'orienter de façon à ce que le premier globule polaire se trouve à 6h ou 12 heures (**Tourney et al., 2002**).

#### **IV.5. Culture cellulaire (différentes observations J1...J6 avec classification embryonnaire)**

Les étapes suivantes sont les mêmes que pour la FIV conventionnelle. Les ovocytes micro-injectés sont cultivés à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub> et 5% O<sub>2</sub> dans un milieu de culture avec huile. Ils sont observés périodiquement sous microscope inversé pour suivre le développement (**Tourney et al., 2002**).

Type of observation	Timing (hours post-insemination)	Expected stage of development
Fertilization check	17 ± 1	Pronuclear stage
Syngamy check	23 ± 1	Expect 50% to be in syngamy (up to 20% may be at the 2-cell stage)
Early cleavage check	26 ± 1 h post-ICSI 28 ± 1 h post-MF	2-cell stage
Day-2 embryo assessment	44 ± 1	4-cell stage
Day-3 embryo assessment	68 ± 1	8-cell stage
Day-4 embryo assessment	92 ± 2	Morula
Day-5 embryo assessment	116 ± 2	Blastocyst

ICSI, intracytoplasmic sperm injection.

**Figure15** : Observation des différents stades de la fécondation jusqu'à la blastulation (**Consensus Istanbul workshop 2011**).

#### **IV.6. Transfert embryonnaire**

Selon les indications de l'ICSI, les embryons choisis sont transférés soit à J2, J3, J5 ou J6 (**Tourney et al., 2002**).

#### **IV.7. Vitrification embryonnaire**

Les embryons surnuméraires de bonnes qualités sont généralement vitrifiés pour un ultérieur transfert (**Journal Officiel, 1999**).

**CHAPITRE II :**

**MATERIEL  
ET  
METHODES**

## II.PARTIE EXPERIMENTALE :

### II.1.Introduction :

Une étude rétrospective (156 couples) a été réalisée sur une période qui s'étend entre le **1<sup>er</sup> janvier 2015 au 31 Mai 2016(17 mois)**. La période de stage : Avril-Août 2016.

Le but de notre travail est d'évaluer la technique de fragmentation d'ADN SCD (Sperm Chromatin Dispersion) sur une population de couples infertiles et candidats à l'ICSI, consultant au sein du centre d'assistance médicale à la procréation «CAMP TIZIRI, Alger ».

Tableau II. (A) : présentation de la série

Paramètres	N(Effectif)
Nombre de dossiers avec DFI	156/3500 (4.45%)
Stérilité primaire	106 /156 (67.10%)
Stérilité secondaire	50/156 (32.89%)
Antécédents de PMA	48/156 (31.41%)

Tableau II. (B) :

	Moyenne	Ecart type	Min-Max
Age (ans)	38,20	5,642	28- 63
Durée de la stérilité (ans)	5	1,189	1-14

### II.2.Explorations biologiques

Le test de fragmentation d'ADN est un test complémentaire après avoir évalué la qualité spermatique (spermogramme, TMS) et l'absence d'infection (spermoculture) à la recherche de germes banaux et mycoplasme.

Un certain nombre d'instruction doit être respecté avant d'effectuer le prélèvement :

- Uriner
- Lavage des mains
- Lavage soigneux de l'organe génital avec une solution bactéricide suivi d'un lavage avec de sérum physiologique stérile.
- Le recueil se fait dans un flacon stérile au niveau du local prévu dans le laboratoire.
- Le patient doit signaler toute perte de fraction
- Le recueil doit être maintenu à une température de 25 à 27 °C(tube entouré de coton) et apporté au laboratoire dans les meilleurs délais (maximum 45 min).

### II.3. La Spermoculture (Recherche de germes banaux et mycoplasmes)

Elle est recommandée avant chaque test de fragmentation d'ADN spermatique (DFI) et de technique de PMA, car une présence d'infection pourrait augmenter le taux de fragmentation d'ADN spermatique.

### II.4. Spermogramme

-Le spermogramme est l'examen de première intention du bilan masculin, afin d'évaluer les caractéristiques spermatiques.

-Une abstinence sexuelle de 2 à 7 jours est recommandée (selon l'OMS 2010).

-Une fiche de renseignement doit être remplie par le préleveur contenant les données de patients (type et durée d'infertilité, les antécédents médicaux, chirurgicaux, fièvre...etc.).

-Toutes les manipulations et analyses doivent être effectuées selon les normes OMS 2010.

-L'échantillon doit être analysé après liquéfaction (30 minutes après l'éjaculation).

#### II.4.1.Examens macroscopiques

- **Aspect** est généralement blanchâtre, lactescent, si le sperme est trop clair, cela peut indiquer une diminution de spermatozoïdes. S'il est jaunâtre, cela est en faveur d'une infection, s'il est hémorragique, il évoque une hémospemie (présence d'hématies dans le sperme).
- **Volume** est mesuré à l'aide d'une pipette graduée.
- **PH** est mesuré à l'aide d'une bandelette de papier pH (**Figure 18**). Le pH doit toujours être mesuré 30 minutes après l'émission, car son alcalinité a tendance à augmenter en fonction du temps.



Figure 16: Papier PH (photo originale)

- **Viscosité** on l'évalue à l'aide d'une pipette par mouvement d'aspiration/refoulement (**Figure19**)
  - Goutte à goutte : viscosité normale,
  - Filament >2 cm : viscosité augmentée



**Figure 17** : évaluation de la viscosité du sperme (photo originale)

**I.4.2. L'étude microscopique du sperme**

- **Mobilité**

Après homogénéisation, on observe une goutte de 10ul de sperme entre lame et lamelle (22x 22) au microscope à grossissement (x 40).

**Tableau III:** représentant les paramètres de mobilité des spermatozoïdes

Type (a)	Rapide progressif
Type (b)	Lent ou faiblement progressif
Type (c)	Mobile non progressif
Type (d)	Immobile

On calcule le pourcentage de chaque catégorie, par exemple le pourcentage de type (a) =  
 Le nombre de spermatozoïde observé de type (a) / le nombre totale de spermatozoïde observé(a)+(b) +(c)+(d).

- **Vitalité**

La proportion de spermatozoïdes vivants doit être déterminée en utilisant le test à l'éosine-nigrosine, s'effectue sur sperme frais.

Après homogénéisation, On mélange 10ul de sperme, 20ul d'éosine et 30ul de nigrosine et on réalise un frottis qui sera observé au microscope à grossissement (x40).

Les spermatozoïdes vivants ne se colorent pas tandis que les spermatozoïdes morts sont colorés en rouge ou en rose pâle. Les cellules mortes ayant des membranes plasmiques lésées laissant pénétrer le colorant.

- **Agglomérat**

Des spermatozoïdes avec des débris où des cellules rondes.

- **Agglutinat**

On parle d'agglutinat lorsque les spermatozoïdes sont les uns sur les autres, le plus souvent due à la rupture de la barrière hémato-spermatique, l'existence d'anticorps anormalement produits par le patient contre ses propres spermatozoïdes.

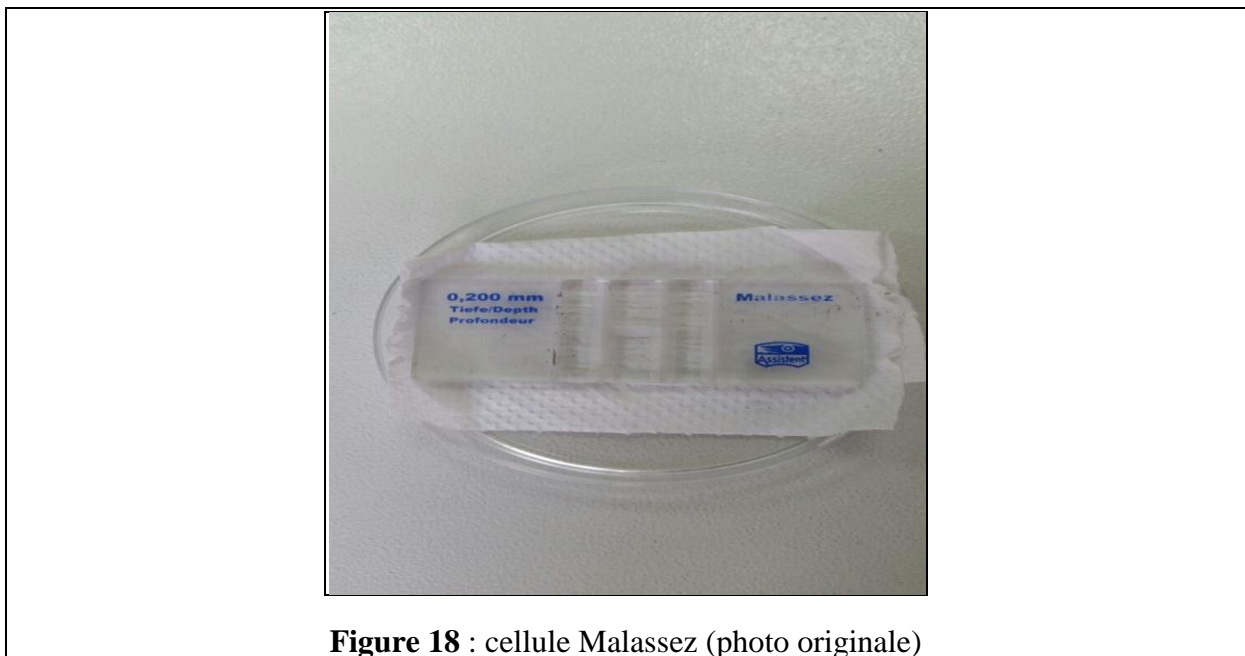
- **Numération**

- **En spermatozoïdes**

Après homogénéisation on réalise une dilution de sperme, qu'on dépose sur une cellule Malassez (**Figure 20**) puis on calcule le nombre de spermatozoïdes en million/ml suivant la loi :

Si on compte par carreau :

$$N = (n) \times \text{inverse de la dilution} \times (y=100) \times 1000$$



**Figure 18** : cellule Malassez (photo originale)

Si on compte par bande

$$N = (n) \times \text{inverse de la dilution} \times (y=10) \times 1000$$

Si on compte toute la cellule :

$$N = (n) \times \text{inverse de la dilution} \times (y=1) \times 1000$$

n : nombre de spermatozoïdes.

y : le nombre de carreau, bande ou toute la cellule.

N : la concentration en spermatozoïdes.

- **En cellules rondes**

Incluent les cellules germinales, les cellules épithéliales et les leucocytes, le calcul se fait de la même façon que pour les spermatozoïdes.



### II.4.3. Le spermocytogramme

C'est un examen cytologique après coloration du frottis spermatique, permettant d'établir un pourcentage de formes typiques et des anomalies des différentes parties des spermatozoïdes : Tête, pièce intermédiaire et queue.

#### Coloration de Shorr

1. Rinçage à l'eau 12–15 fois\*
2. Haematoxyline 1–2 minutes
3. Rinçage à l'eau 12–15 fois\*
4. Ammoniaque + éthanol 10 fois\*
5. Rinçage à l'eau 12–15 fois\*
6. Ethanol 50% 5 minutes
7. Shorr 3–5 minutes
8. Ethanol 50% 5 minutes
9. Ethanol 70% 5 minutes
10. Ethanol 90% 5 minutes

#### Classification de David modifiée (Jouannet, 2001).

- **Anomalies de la tête :** Allongée, amincie, macrocéphalie, microcéphalie, tête multiple, base anormale, acrosome absent ou mal formé.
- **Anomalies de la pièce intermédiaire :** Reste cytoplasmique, angulation, grêle.
- **Anomalies du flagelle :** Absent, court, irrégulier, enroulé, multiple.



Figure 19: Spermascoring (photo originale)

**Tableau IV** : représentant les critères des normalités du sperme selon (**OMS 2010**)

<b>Paramètres</b>	<b>Valeurs normales (OMS, 2010)</b>	<b>Valeurs anormales</b>	<b>Pathologie</b>
<b>Volume de l'éjaculat</b>	≥ 1.5 ml	0 ml < 1.5 ml > 6 ml	Aspermie Hypospermie Hyperspermie
<b>PH</b>	7,2 à 8	< 7.2 >8	Acide Basique
<b>Numération des spermatozoïdes</b>	≥ 15 millions / ml	Absence de spermatozoïde à l'examen direct et après centrifugation  Absence de spermatozoïde à l'examen direct mais observé après centrifugation  <15 millions / ml	Azoospermie  Cryptozoospermie  Oligozoospermie
<b>Mobilité 30 minutes à 1 heure</b>	≥ 32 % de mobilité progressive (a+b) et ≥ 40% (a+b+c)	< 32 %	Asthénozoospermie
<b>Vitalité 30 minutes à 1 heure</b>	≥ 58 %	< 58 %	Nécrozoospermie
<b>Formes typiques</b>	≥ 4 %	< 4 %	Tératozoospermie
<b>Leucocytes</b>	< 1 million / ml	≥ 1 million / ml	Leucospermie
<b>Cellules rondes</b>	< 2 millions / ml	–	–
<b>Absence d'éjaculat</b>	–	–	Anéjaculation

## II.5. Test de migration et survie (TMS)

C'est une technique permettant la sélection des spermatozoïdes selon la densité du noyau en utilisant des gradients de densité.

Ce n'est qu'après évaluation des caractéristiques spermatiques de base qu'on peut lancer le test

Préparation des gradients de densité.

Gradient 90% = 900µl de pure sperme à 100% + 100µl de FertiCult Flushing (**Figure 22**).

Gradient 45% = 450µl pure sperme à 100% (**Figure 23**) + 550µl de FertiCult Flushing

Dans un tube conique on dépose goutte à goutte 1ml de gradient de 90%, puis 1ml de gradient de 45%. Dépôt 1ml de sperme homogénéisé sur les gradients.

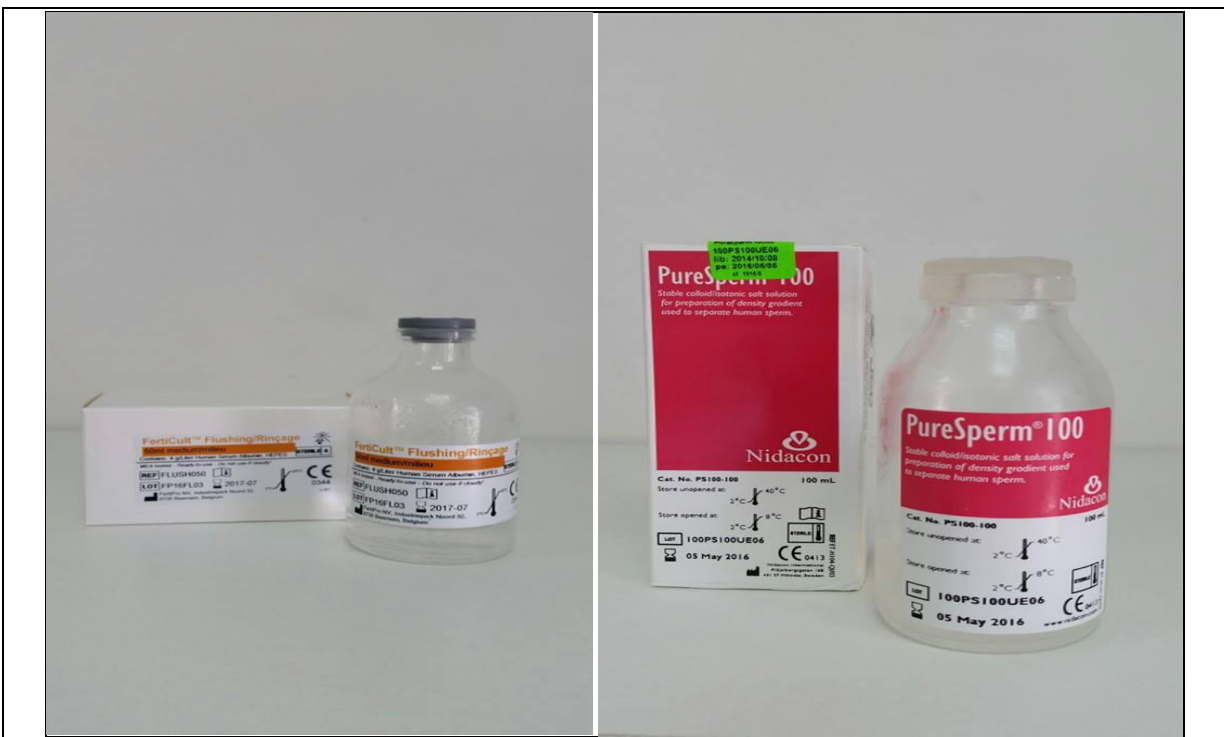
Centrifugation pendant 20 minutes à 1400 tour/min (300g).

Retirer le surnageant en laissant un culot de 200 à 250 µl qu'on dépose dans 2 ml de FertiCult Flushing pour le lavage.

Centrifugation pendant 10 minutes à 1800 tour/min (600g).

Enlever le surnageant ne laissant que 250µl.

On réévalue après le TMS : la mobilité, la concentration et la morphologie.



**Figure 20:** Fercult Flushing

(Photos originales)

**Figure 21:** gradientPureSperm

## II.6. Test de Fragmentation d'ADN (SCD)

La procréation chez l'Homme dépend de l'intégrité, et la compaction de l'ADN spermatique qui est protégé d'un potentiel dommage durant le transport.

Méthode de dispersion de la chromatine spermatique **SCD** (Sperm Chromatin Dispersion) (**Fernandez *et al*, 2005**) permet d'estimer le potentiel de fragmentation d'ADN utilisé en routine dans beaucoup de centres d'AMP.

### II.6.1.Principe

- Le brin d'ADN contenant des cassures est plus facilement dénaturé (la fin de la cassure est l'origine de la dénaturation)
- La libération partielle des protéines chromatiques se caractérise par une dispersion des boucles d'ADN autour de l'ADN nucléaire qui reste attaché aux protéines résidus.

### II.6.2. Description de Kit

Halosperm® de halotech DNA-Madrid, Espagne ; chaque kit contient 10 tests

Il est recommandé de conserver le Kit à une température ambiante, une fois ouvert le conserver au réfrigérateur.

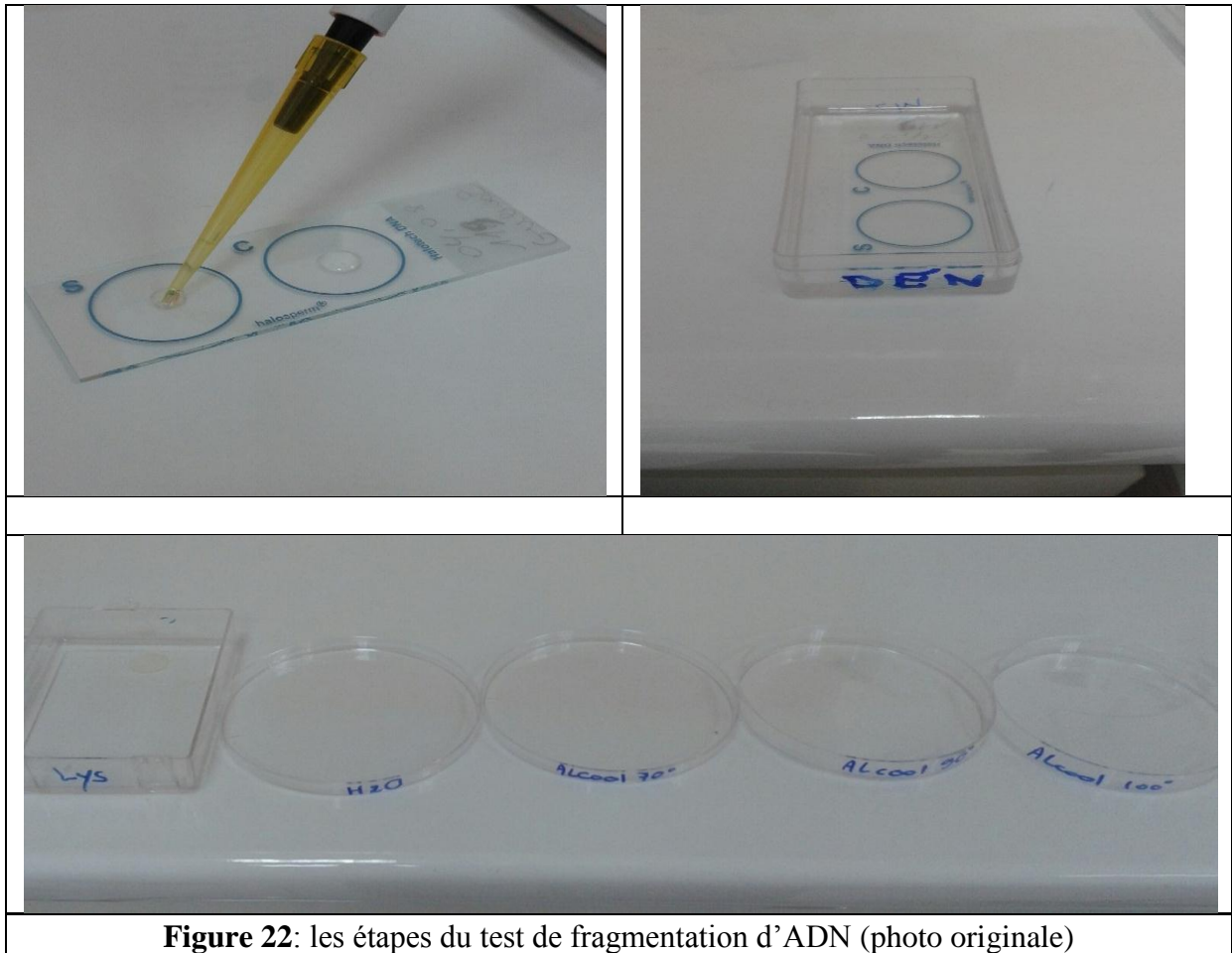
- SCS(Super Coated Slides).10 unites
- ACS(Agarose Cell Support).10 Eppendorfs
- DA: 1ml d'une solution d'acide dénaturante
- LS(lysis solution) un flacon de 100ml

### II.6.3. Protocole :

Toutes les manipulations sont réalisées à une température ambiante :

- L'agarose est fluidifié en plongeant le tube Eppendorf (100µl) pendant 5 minutes dans un bain Marie à 95-100°C.
- Le tube Eppendorf est passé à une étuve sèche à 37 °C pendant 5 minutes pour équilibrer la température.
- Diluer la préparation de sperme jusqu'à obtention 5 à 10 millions/ml ou une simple centrifugation de sperme natif dans le cas des oligospermies sévères.
- Ajouter 25µl de préparation de sperme dilué ou de sperme centrifugé dans le tube Eppendorf d'agarose et mélanger délicatement à l'aide d'une pipette.
- Déposer une goutte de 15µl de la suspension cellulaire sur la partie traitée de la lame, et couvrir avec une lamelle 22x22. Tout au long de ce processus, la lame doit rester horizontale.
- Placer La lame sur une surface froide à 4°C puis dans le réfrigérateur pendant 5 minutes, temps nécessaire à la gélification de l'échantillon.
- Préparer la solution DA : 80 µl DA + 10 ml d'eau distillée, mélanger et placer la solution dans une boîte de pétri.
- Retirer la lame du réfrigérateur et faire glisser la lamelle délicatement de manière horizontale.

- Immerger immédiatement la lame dans la solution DA (toujours horizontalement). Incuber pendant 7 minutes.
- Immerger la lame dans 10 ml de la solution LS et incuber pendant 25 minutes.
- Enlever la lame horizontalement et la rincer abondamment avec de l'eau distillée. Incuber pendant 5 minutes, pour se débarrasser de la solution LS.
- Rincer la lame par l'éthanol 70% pendant 2 min, puis par l'éthanol 90% pendant 2 minutes, puis dans l'éthanol 100% pendant 2 minutes.
- Laisser séchée à température ambiante.



**Figure 22:** les étapes du test de fragmentation d'ADN (photo originale)

### Contrôle

**Contrôle positif :** les spermatozoïdes avec halo : suivre le même protocole en éliminant l'incubation dans la solution d'acide dénaturant.

**Contrôle négatif :** les spermatozoïdes sans halo : suivre le même protocole en incubant dans une solution dénaturante non diluée pendant 5min.

### II.6.4. Coloration

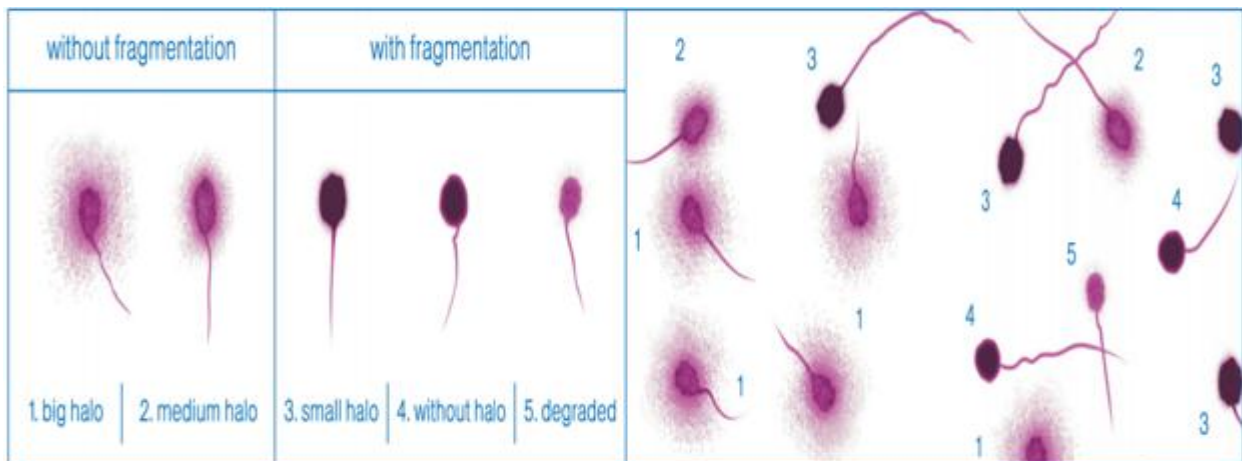
- Incuber la lame dans un récipient contenant le colorant de May Grunwald (1/10) pendant 3min
- Incuber la lame dans un récipient contenant le colorant de Giemsa (15 min)
- La lecture se fait sous un microscope optique x40 ou x100 à immersion.

## II.6.5. Classification

IL est recommandé de compter au moins 500 spermatozoïdes selon les critères de (Fernandez *et al.*, 2005).

La largeur du halo est en relation avec la quantité de dommages d'ADN spermatique. La perte de protéines de chromatine sous forme de boucle d'ADN en se dispersant tout autour tout et en restant attaché aux protéines résidus.

- **Spermatozoïdes sans fragmentation d'ADN**
  - **Spermatozoïde avec un grand halo** : largeur du halo  $\geq$  petit diamètre du core.
  - **Spermatozoïde avec un halo moyen** : la largeur est comprise entre grand halo et halo minuscule.
- **Spermatozoïdes avec fragmentation d'ADN**
  - **Spermatozoïde avec un halo minuscule** : largeur du halo  $\leq$  1/3 diamètre du core.
  - **Spermatozoïde sans halo**
  - **Spermatozoïde sans un halo et dégradé** : Core irrégulier ou faible coloration.



**Figure 23:** Classification des différents diamètres d'halos

1 : grand halo

3 : halo minuscule

5 : dégradé

2 : halo moyen

4 : sans halo

DFI% =  $\frac{\text{Nombre de spermatozoïde Fragmenté}}{\text{Totale de spermatozoïde compté}} \times 100$

Totale de spermatozoïde compté

## II.6.6. Interprétation des résultats

Le taux de fragmentation d'ADN spermatique est exprimé par un indice (DFI).

Le seuil est défini à 30% (Evenson *et al.*, 1999) et (Larson *et al.*, 2000) pour identifier les patients considérés comme ayant un taux élevé ou diminué de fragmentation d'ADN spermatique.

- inférieur ou égal à 30% Fragmentation d'ADN spermatique moyenne à bonne.
- supérieur à 30% Fragmentation d'ADN spermatique élevée.

**CHAPITRE III :**

**RESULTATS**

**ET**

**DISCUSSION**

### III. Analyse Statistique

-L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel XLSTAT 2016.

-Les données statistiques sont exprimées sous forme de moyennes.

-Une étude descriptive d'un échantillon de couples candidats à l'ICSI, avec l'exploitation des données concernant les caractéristiques du sperme, et le devenir de l'ICSI.

- **La vérification de la Normalité des variables**

Pour vérifier la normalité des distributions on applique un test de Shapiro-Wilk, les résultats du test sont représentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau V:** résultats donnés par le test de Shapiro-Wilk de la normalité des différents paramètres.

Variable	W	P value	Alpha
Résultat DFI	0,928	<0.0001	0,05
Mobilité (a+b)	0,947	<0,0001	0,05
Vitalité	0.139	<0.0001	0.05

➤ **Interprétation du test :**

H0 : la variable dont provient l'échantillon suit une loi normale.

H1 : la variable dont provient l'échantillon ne suit pas une loi normale.

Etant donné que la p-value calculée est inférieure au niveau de signification  $\alpha=0,05$ , on doit rejeter l'hypothèse nulle H0, et retenir l'hypothèse alternative H1.

**La Normalité n'est pas confirmée.**

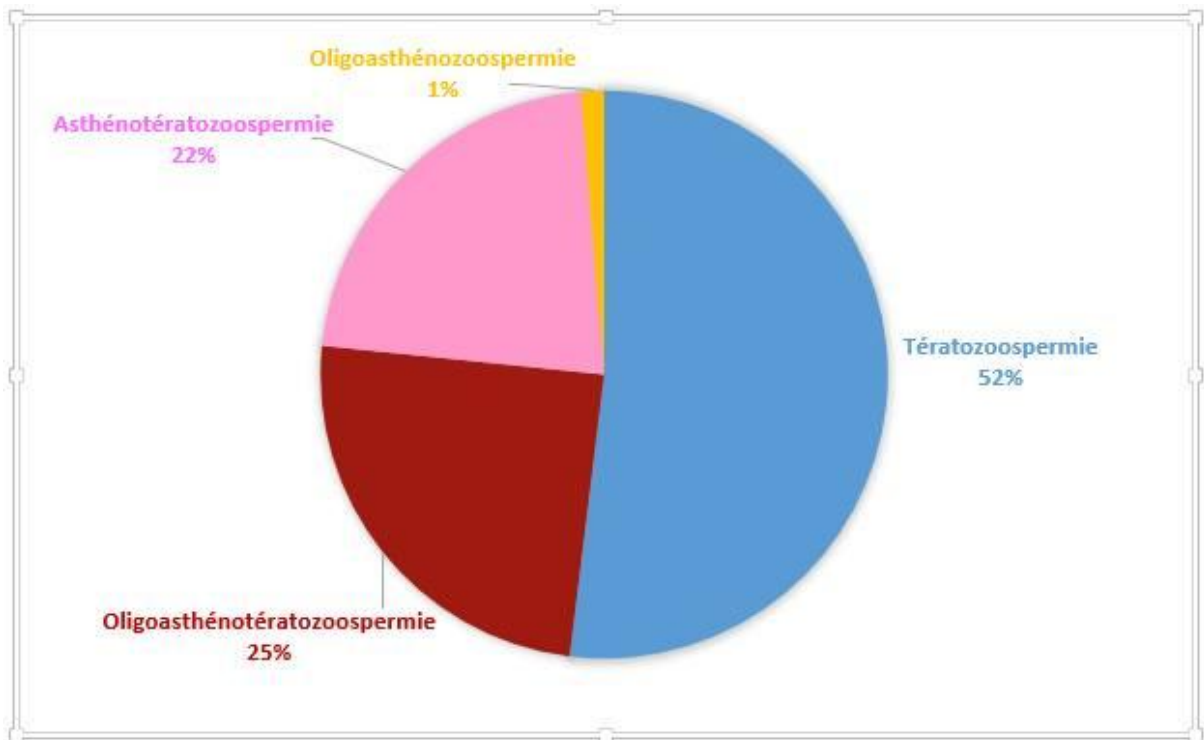
Les tests statistiques utilisés dans cette étude seront les tests non paramétriques.

### III.1 EXPOSER DES RESULTATS

**Tableau VI:** Les paramètres spermatique de la population étudiée

Paramètres spermatiques	Moyenne	Ecart type	Min-Max	N (effectif)
Volume (ml)	2,90	3,93	0,1 – 8	156
Concentration SPZ (million/ml)	41,49	45,097	0,12- 290	156
Mobilité des SPZ (%)	35	2,171	1 -72 %	156
DFI (%)	20,25	13,916	19-74	156





**Figure 24 :** La qualité spermatique chez les patients de la population étudiée.

**L'anomalie la plus fréquente dans notre échantillon est la Tératozoospermie avec un pourcentage de 52%, en deuxième position : l'Oligoasthénotératozoospermie avec un pourcentage de 25%, puis l'Asthénotératozoospermie avec un pourcentage de 22% et enfin l'oligoasthénozoospermie avec un pourcentage de 1%.**

### III.2. Corrélation entre l'âge et le DFI

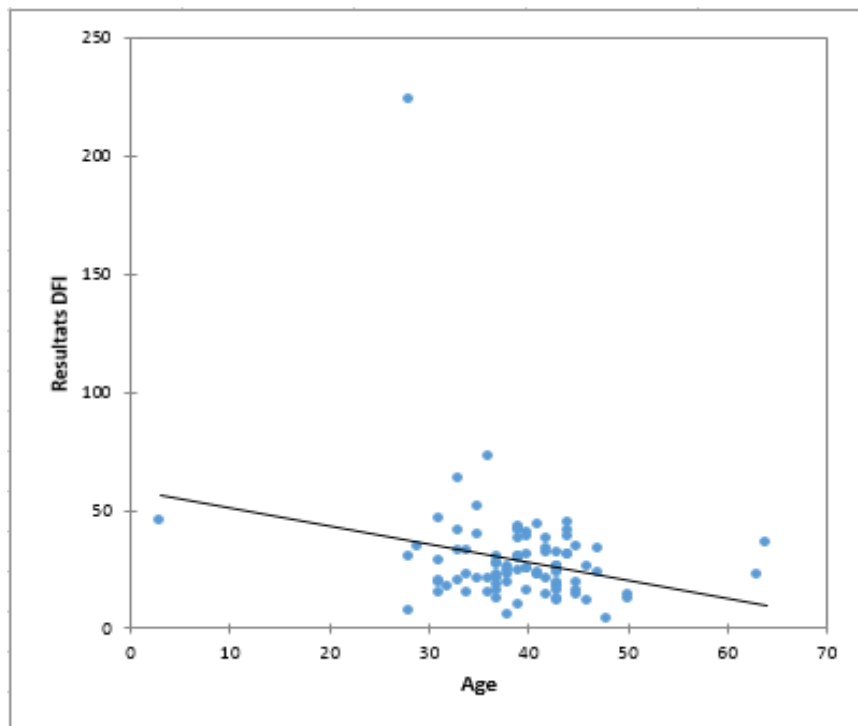


Figure 25: corrélation entre l'âge et DFI

**On observe une faible corrélation avec un  $P = 0.028$  entre le taux de DFI et l'âge des patients, et avec un coefficient de corrélation ( $r = -0.052$ ), (Inversement proportionnels).**

Nous remarquons donc que dans notre échantillon l'âge des hommes peut être un facteur influent sur le DFI. Ce même résultat a été trouvé par (Spano *et al*, 2000) ; (Moskovtsev *et al*, 2006) ; (Wyrobek *et al*, 2006). Sergey *et al*. (2009), ont montré dans un groupe d'hommes âgés de plus de 50 ans que les dommages d'ADN spermatique étaient importants ( $36,8\% \pm 17,6\%$ ), correspondant à un mauvais potentiel de fertilité par rapport à un groupe d'hommes âgés de 30 ans, où le DFI était bas ( $14,7\% \pm 9,9\%$ ) et correspondait à un excellent potentiel de fertilité.

L'augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique avec l'âge est un processus qui est lié à une augmentation des cassures de l'ADN double brin et un système de sélection de cellules apoptotiques qui est moins efficace (Singh *et al*, 2003). De plus, l'ADN des spermatozoïdes éjaculés s'avère plus stable chez les patients les plus jeunes (Lachaud *et al*, 2004).

Cependant, (Sun *et al*. 1997) ont trouvé une indépendance du facteur âge et DFI.

### III.3. Corrélation entre le tabagisme et le DFI

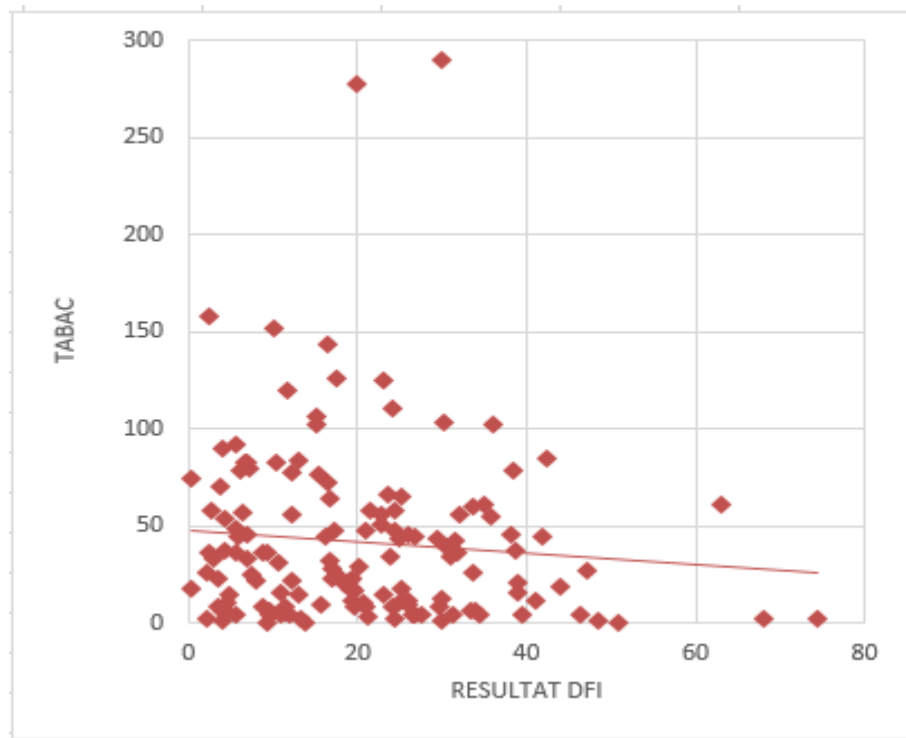


Figure 26 : corrélation entre le tabagisme et le DFI

D'après le résultat démontré dans le graphe, nous remarquons l'absence de corrélation DFI/tabagisme avec ( $p=0,187$ ,  $r=0,012$ ).

Ainsi, et bien qu'il soit bien connu que le tabagisme soit associé à une numération et mobilité spermatique faibles, une augmentation des formes anormales de spermatozoïdes et des dommages de l'ADN spermatique (Spanoet *et al.*, 1998); (Potts *et al.*, 1999).

Nos résultats pourraient être expliqués par la petite taille de l'échantillon et le nombre réduit des fumeurs (39 fumeurs / 156 patients).

L'éjaculat des hommes fumeurs subit un stress oxydant par le fait que leur sperme est caractérisé par des niveaux plus élevés de dommages oxydatifs de l'ADN, de fragmentation élevée de la chromatine et de basses concentrations des vitamines antioxydants (Fraga *et al.*, 1996). Il a été postulé que le tabagisme augmente la production des ROS leucocytaires avec, par conséquent, des effets nocifs sur les spermatozoïdes matures (Potts *et al.*, 1999).

Cependant, d'autres études ont montré qu'il n'y a pas une relation entre le DFI et le tabagisme, comme nous venons de le trouver dans notre étude, telle que l'étude de (Loft *et al.*, 2003) qui ont étudié le niveau des dommages oxydatifs de l'ADN, ou l'étude réalisée par (Sergerie *et al.*, 2000) qui ont étudié le taux de fragmentation de l'ADN spermatique par test TUNEL.

Le fait que certains auteurs n'aient pas trouvé un lien entre le tabagisme et le DFI reviendrait peut être à la faible quantité de cigarettes fumées par jours, à la présence d'autres facteurs

induisant les ROS comme les polluants ou bien à la résistance au stress oxydant chez certains patients (différences de background génétique, de régime alimentaire, y compris la consommation de vitamine C) ou bien à la numération des spermatozoïdes (Loft *et al.*, 2003).

### III.4. Etude de la relation entre le DFI et différents paramètres standards du sperme

#### III.4.1. volume

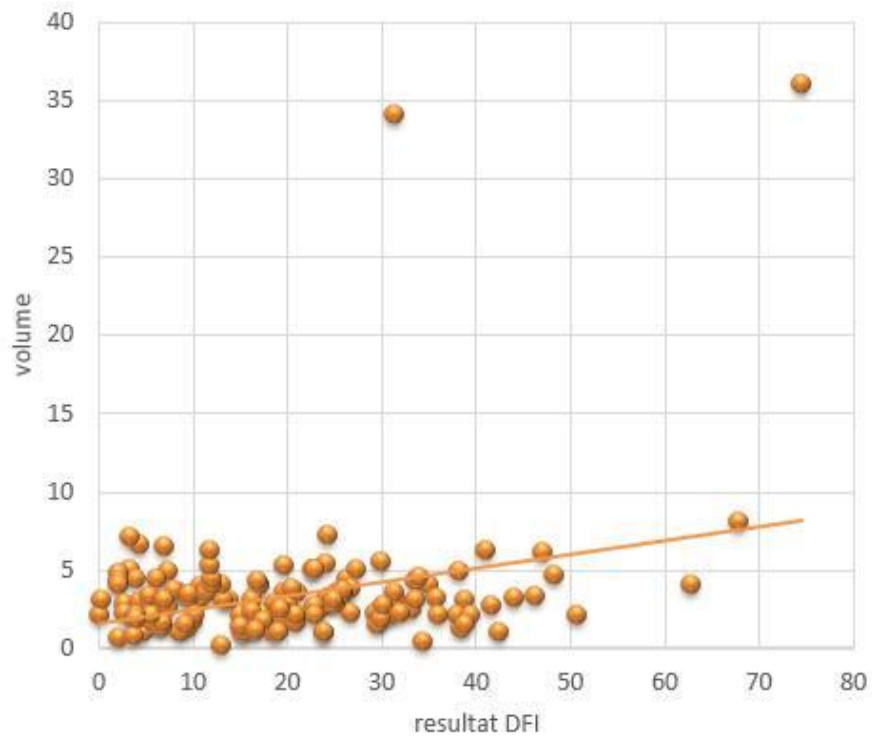
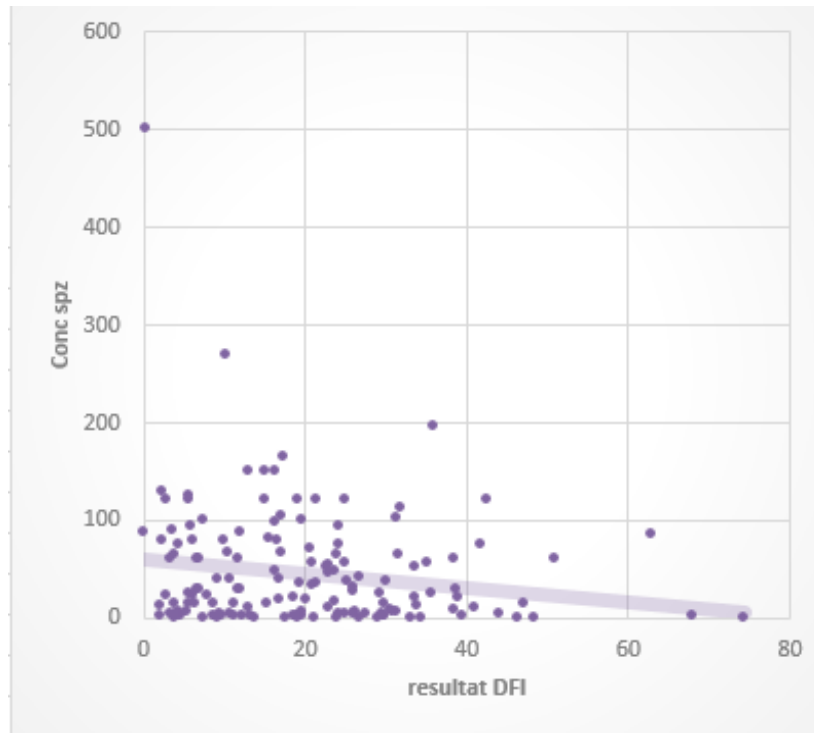


Figure 27 : Corrélation entre Le Volume et le DFI.

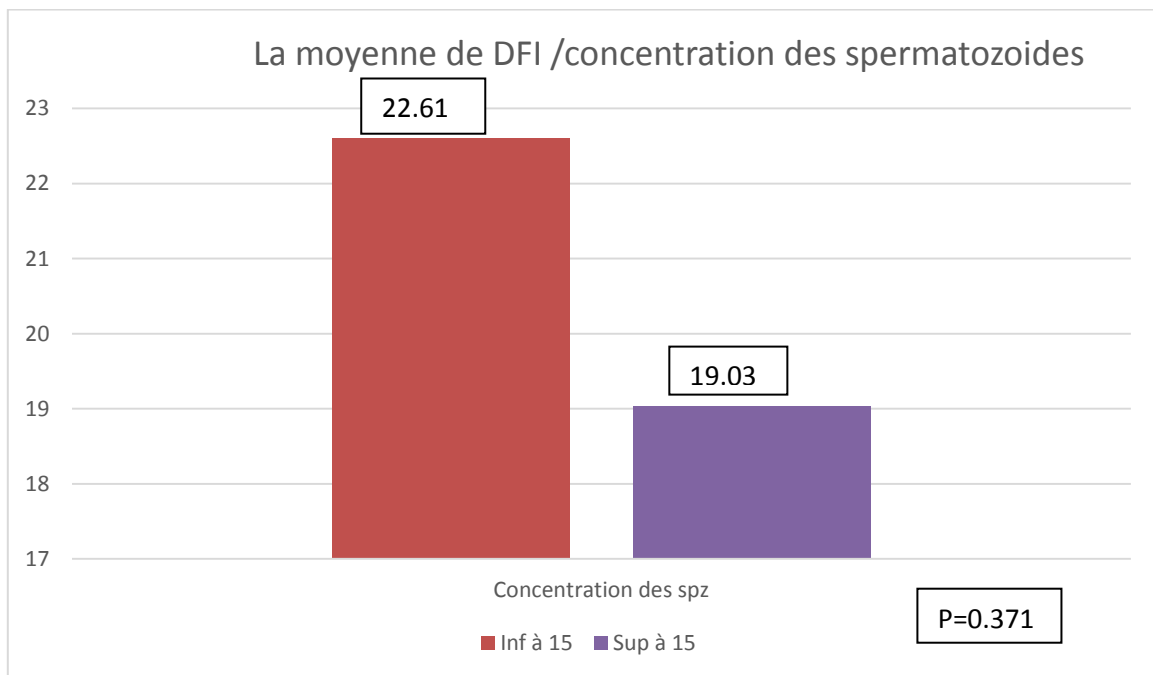
D'après les résultats démontrés sur le graphe, on a constaté qu'il n'existe pas une corrélation entre le volume du sperme et les résultats de DFI, selon le test de Spearman ( $p=0.448$  et  $r=0.004$ ).

#### III.4.2. concentration du sperme

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre le volume, la concentration du sperme et le DFI dans l'échantillon étudié. Selon le Test de Spearman  $p=0.187$  et coefficient de corrélation ( $r= 0.012$ )



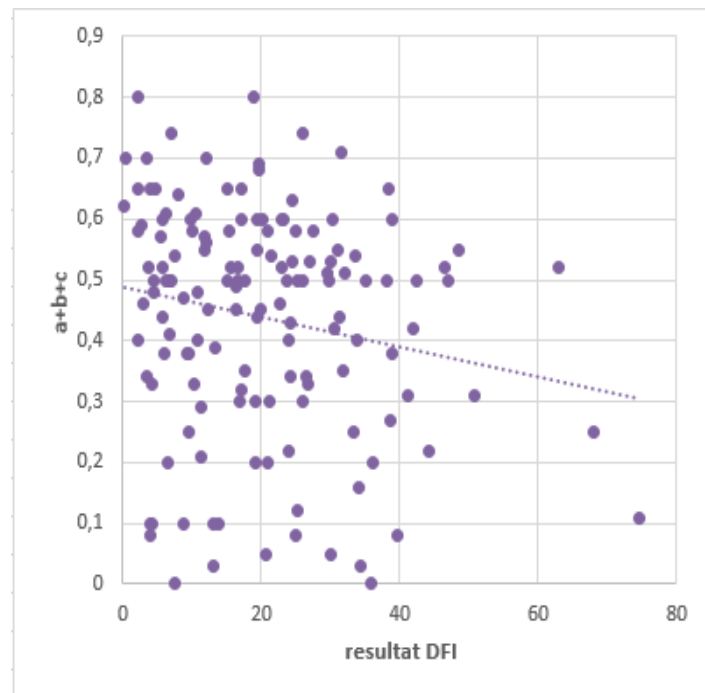
**Figure 28:** corrélation entre la concentration des spermatozoïdes et le DFI



**Figure 29 :** les moyennes de DFI en fonction de la concentration des spermatozoïdes chez de groupes de patients.

**D'après l'histogramme et l'analyse par le test kolmogorov (risque d'erreur  $\alpha=0.05$ ) et  $p=0.371$ , on constate que la différence entre les moyennes de DFI n'est pas significative dans les deux groupes ([ ] < 15 millions/ml, [ ] >15 millions/ml).**

### III.4.3. mobilité



**Figure 30** : corrélation entre la mobilité (a+b) en fonction de DFI

**La corrélation entre la mobilité et le DFI est représentée au niveau du graphe, montre d'après la droite régression obtenue qu'il existe une corrélation négative entre la mobilité et le DFI ( $r = -0.178$  ;  $P = 0.034$ ) ce qui montre bien que plus le DFI augmente plus la mobilité diminue (inversement proportionnel).**

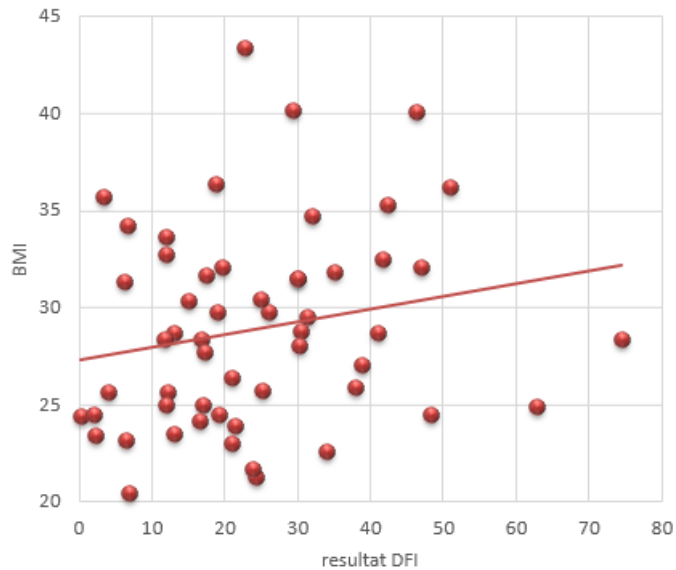
En effet, l'existence de corrélation entre la mobilité et le taux de fragmentation d'ADN spermatique, que nous venons de démontré, est une confirmation des résultats des études préalables (**Sun *et al.*, 1997**) ; (**Lopes *et al.*, 1998b**) ; (**Sakkas *et al.*, 1999**) ; (**Irvine *et al.*, 2000**) ; (**Apedaile *et al.*, 2004**) ; (**Smit *et al.*, 2007**).

La corrélation entre la fragmentation d'ADN spermatique et les paramètres standard peut être expliquée par la complexité des phénomènes physiologiques et moléculaires au cours de la spermatogenèse. Sachant que les dommages d'ADN peuvent se produire au niveau testiculaire ou post-testiculaire, il est compréhensible que les études utilisant différentes méthodes d'évaluation d'ADN aient trouvé de divers niveaux de corrélation avec les paramètres spermatiques standards (**Saleh *et al.*, 2002**).

Cependant, certains auteurs n'ont montré aucun rapport entre les dommages d'ADN et les paramètres spermatiques (**Evenson *et al.*, 2002**);(**Larson-Cook *et al.*, 2003**); (**Cohen-Bacrie *et al.*, 2009**).

(**Zini *et al.*, 2001b**) ont identifié une corrélation négative entre le pourcentage des spermatozoïdes avec un ADN dénaturé et la mobilité.

### III.5. Corrélation entre BMI et DFI



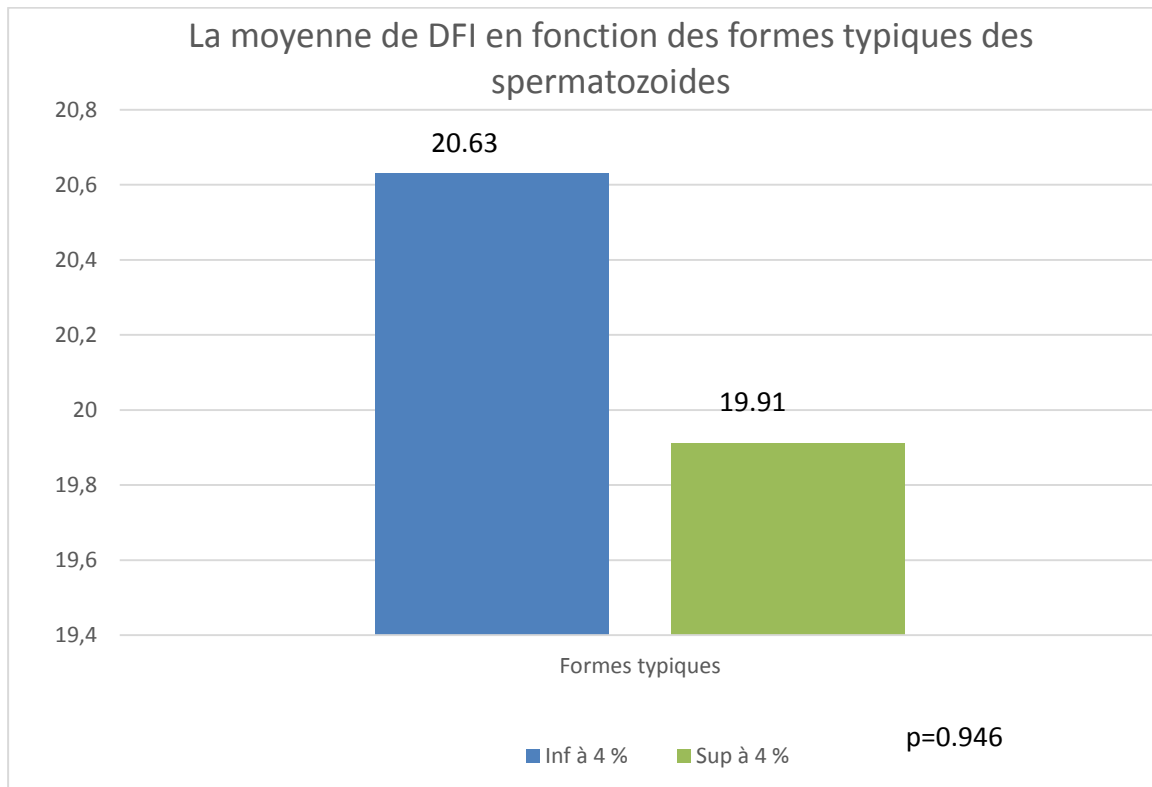
**Figure 31** : Correlation entre BMI et DFI.

**D’après nos résultats démontrés sur le graphe, il n’existe pas de corrélation entre le BMI et les résultats de DFI chez les hommes, et cela pourrait être expliqué par la petite taille de l’échantillon et le nombre réduit des patients qui ont été interrogés (59 patients avec BMI répertorié).**

En revanche, d’après **Dupont et al. (2013)** 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. L’obésité abdominale tend également à diminuer le nombre total de spermatozoïdes et leur mobilité.

### III.6. Corrélation entre la morphologie spermatique (anomalie de la tête) et le DFI

Nous n'avons pas trouvé une corrélation entre les anomalies de la tête des spermatozoïdes et les résultats de DFI avec un  $p=0.029$  et un coefficient de corrélation  $r=0.031$ .



**Figure 32** : les moyennes de DFI des deux groupes en fonction des valeurs des formes typique des spermatozoïdes.

**D'après l'histogramme et l'analyse par le test kolmogorov (risque d'erreur  $\alpha=0.05$ ) et  $p=0.946$ , on constate que la différence entre les moyennes de DFI n'est pas significative dans les deux groupes (FT < 4%, FT > 4%).**

Ce même résultat a été confirmé par (Younglai *et al.*, 2010). Aucune corrélation n'a été établie entre le pourcentage de formes typiques et la fragmentation d'ADN spermatique.

La structure anormale de la chromatine et les cassures des brins d'ADN sont corrélés avec différentes formes atypiques, tel que la présence combinée des têtes macrocéphales et des flagelles multiples (Menkveld *et al.*, 2011) ou présence de globozoospermie combinée avec l'augmentation des taux d'aneuploïdes (Ombelet *et al.*, 1997).

En revanche, les têtes amincies, ont été liées avec des fausses couches inexplicées induites par l'augmentation de la fragmentation d'ADN (Carrell *et al.*, 2003).



### III.7. DFI et qualité embryonnaire

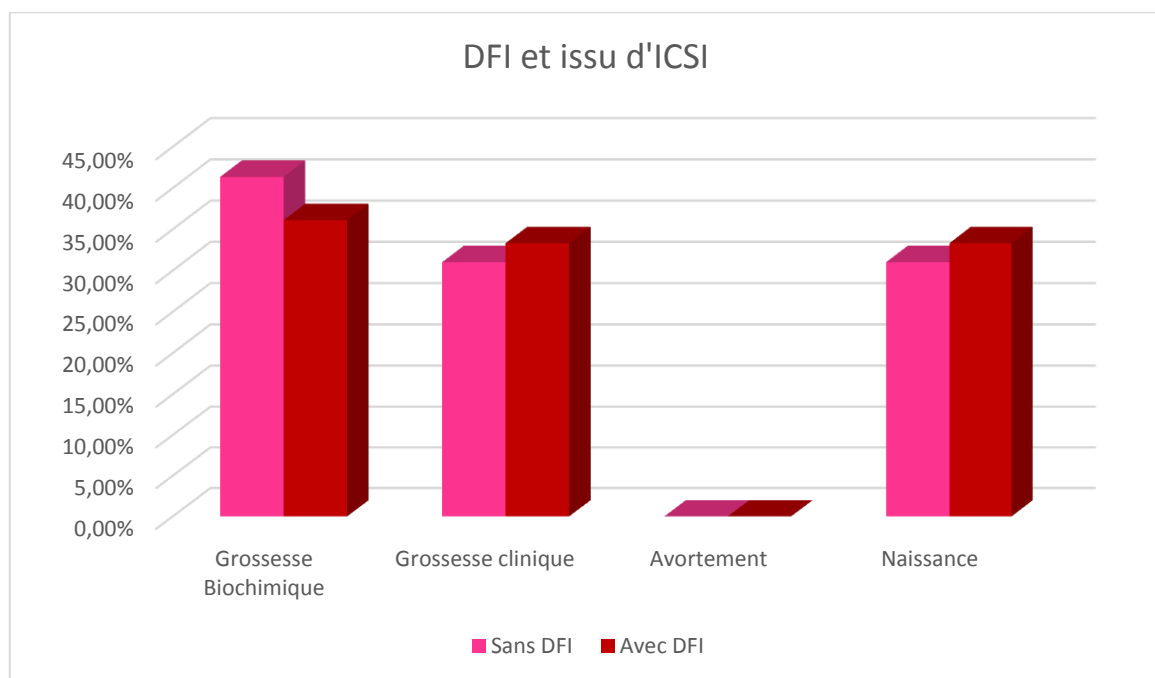
**Les patients candidats à l'ICSI de notre série avaient un DFI corrigé par des antioxydants, ou sous traitement, et la sélection des spermatozoïdes étaient aléatoire.**

Par contre plusieurs autres études ont révélé l'existence d'une association entre le niveau de fragmentation de l'ADN spermatique et la qualité de la fragmentation embryonnaire après l'ICSI (Aboulghar *et al.*, 1997) ; (Brinkworth *et al.*, 2000); (Virant-Klun *et al.*, 2002); (Perreault *et al.*, 2003) ; (Saleh *et al.*, 2003) ; (Borini *et al.*, 2006) ; (Muriel *et al.*, 2006); (Babazadeh *et al.*, 2010). Plusieurs études ont démontré que des anomalies dans l'ADN paternel affectent négativement la qualité embryonnaire (Virro *et al.*, 2004), (Benchaib *et al.*, 2007), (Simon *et al.*, 2010).

L'absence de corrélation entre l'ADN fragmenté et la qualité embryonnaire peut s'expliquer aussi par l'effet plus tardif de l'expression du génome paternel (Hazout *et al.*, 2008). Il est bien connu que l'expression génique principale dans les embryons humains de pré-implantation commence deux cycles cellulaires plus tard, entre le stade 4-cellules et le stade 8-cellules (Tsarik *et al.*, 1986, 1988 ; Braude *et al.*, 1988), autrement dit l'effet paternel n'intervient qu'au moment de l'activation du génome embryonnaire au 3ème jour environ après la fécondation. (Hazout *et al.*, 2008).

Bien que l'ovocyte peut réparer quelque dommage d'ADN (Bazrgar *et al.*, 2014). Si le taux des dommages d'ADN dépasse la capacité de l'ovocyte à réparer complètement ces dommages, les cellules embryonnaires subissent l'apoptose.

### III.8. DFI et issu d'ICSI



**Figure 33 :** Comparaison de l'issu d'ICSI entre deux groupes (avec et sans DFI).

Nous avons tenté de déceler une éventuelle influence de DFI sur l'issu de l'ICSI, et pour cela on a éliminé les facteurs d'infertilité féminins chez les couples candidats à l'ICSI, et on a pris deux groupes : des couples dont les hommes ont fait un test de DFI et d'autres qui ne l'ont pas

fait, la tranche d'âge de femmes étudiée était  $\leq 37$  ans, et on a trouvé une certaine différence entre les deux groupes (Avec et sans DFI). On a observé un taux de grossesse biochimique un peu plus élevé chez les patientes dans le groupe (sans DFI). Des résultats similaires ont été trouvés par d'autres études (**Zini Sigman, 2009**), (**Babazadeh et al., 2010**). Pour le groupe des patientes (avec DFI), un taux de grossesse clinique légèrement élevé, un taux similaire de fausses couches et un taux de naissance légèrement plus élevé notamment. Notre étude a eu comme résultat l'absence de différence significative entre les deux catégories de patientes du point de vue grossesse biochimique ou Clinique (l'implantation) et la naissance. Des résultats similaires ont été trouvés par d'autres études (**Van Steirteghem et al., 1993; Payne et al., 1994; Tournaye et al., 1994; Nagy et al., 1995; Silber et al., 1995 ; Bungum et al., 2004, 2006; Gandini et al., 2004; Check et al., 2005; Huang et al., 2005; Collins et al., 2008; Lin et al, 2008 ; Zini et Sigman, 2009; Babazadeh et al., 2010**). (**Hammadeh et al., 1996**) ont démontré que ni la condensation de la chromatine ni la morphologie des spermatozoïdes pourraient évaluer le potentiel de fertilisation, le clivage embryonnaire ou le taux de grossesse dans l'ICSI. Il faut savoir aussi que ces controverses concernant la valeur prédictive du DFI pourraient être expliquées par la capacité de réparation de l'ADN spermatique par l'ovocyte (**Sakkas et al., 2010**).

## CONCLUSION

La fertilité est un état multifactoriel, qui implique la participation des deux gamètes, l'intégrité du génome paternel est crucial pour un bon développement embryonnaire.

L'examen conventionnel du sperme permet au clinicien d'avoir un aperçu général sur la santé reproductrice masculine, l'évaluation de la fragmentation d'ADN spermatique a été introduite en routine pour plus d'exactitude en diagnostic. Cependant, la physiologie et l'étiologie de ces cassures d'ADN ne sont pas complètement connues.

La fragmentation d'ADN spermatique est un phénomène normal, observé à faible taux chez les individus fertiles mais son augmentation peut avoir un effet négatif entérme de grossesses spontanées ou techniques d'AMP.

Il existe plusieurs essais permettant l'estimation de la fragmentation d'ADN : SCSA (sperm chromatin structure assay), analyse unicellulaire par électrophorèse de gel (COMET), marquage terminal in situ TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) et SCD (Sperm Chromatine dispersion)

Des controverses existent sur quelle méthode est la plus fiable ou celle qui détecte sensiblement les cassures simple ou double brin, de façon directe ou indirecte

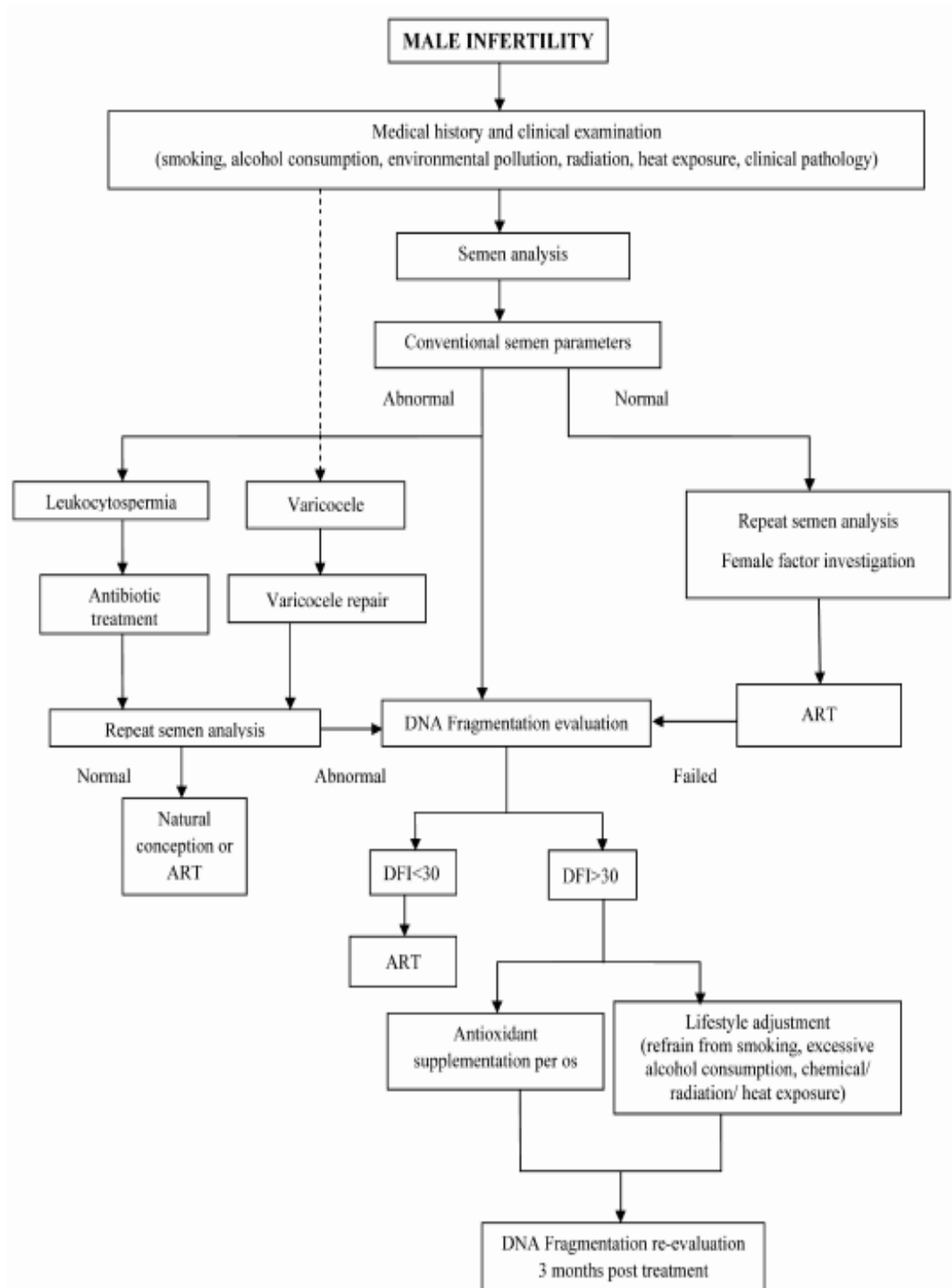
Une standardisation des protocoles des différents tests et leurs seuils est plus que nécessaire pour pouvoir établir de bonnes pratiques aux laboratoires d'andrologie. Il est important de valider ces tests comme biomarqueurs potentiel de la prédiction de naissance et non de grossesse en cycles AMP et naturel. La technique SCD utilisée dans notre travail est une technique opérateur-dépendante, une technique répondu dans beaucoup de laboratoires d'andrologie à travers le monde, nos résultats ne montrent pas une nette amélioration en termes de grossesses cliniques ou naissance, pas de diminution des fausses couches, ceci dit, ça reste une étude rétrospective réalisée sur une petite série.

La capacité de l'ovocyte à réparer l'ADN spermatique est très variables ce qui rend l'interprétation de la survenue de grossesse plus compliquée ; le grand impact de la fragmentation d'ADN spermatique sur les résultats d'AMP chez les couples dont la femme présente une pauvre réserve ovarienne suggère le rôle modulateur du facteur féminin. L'ovocyte a la capacité de réparer l'endommagement de l'ADN spermatique lorsque l'endommagement est à moins de 8%. La capacité de l'ovocyte à réparer les dommages d'ADN dans le spermatozoïde fécondant dépend aussi du type de dommage de l'ADN spermatique

IL est clair qu'avec l'augmentation de l'âge maternel la réserve de l'ARNm dans l'ovocyte diminue aussi bien que sa capacité de la réparation d'ADN.

La prise d'antioxydant semble avoir un effet bénéfique en réduisant l'indice de fragmentation d'ADN spermatique, l'introduction de la technique **PICSI** (Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection) permet de choisir les spermatozoïdes les plus matures, l'utilisation des spermatozoïdes prélevés des testicules prend de plus en plus de place en routine, plus d'études sont nécessaires pour éclaircir le bénéfice apporté par toutes ces voies.

## RECOMMANDATION



**Figure 34:** Stratégie de la prise en charge diagnostic-thérapeutique en infertilité masculine (Benchaib et al, 2007).

## Références Bibliographiques

- **Agarwal A and Allamaneni SS 2004:** The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review *Minerva Ginecologica* **56** 235-245.
- **Aitken RJ and Krausz C, 2001:** Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome *Reproduction* **122** 497–506.
- **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, R.J., West, K.M., 1990:** Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int. J. Androl.* **13**, 433–451
- **Alvarez, J.G., Sharma, R.K., Ollero, M., Saleh, R.A., Lopez, M.C., Thomas Jr., A.J., Evenson, D.P., Agarwal, A., 2002:** Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil. Steril.* **78**, 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.
- **Andersen AN, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe, 2001.** Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2005;20(5):1158J-76.
- **Arabi, M., 2004:** Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Andrologia* **36**,305–310.
- **Baird DM, Britt-Compton B, Rowson J, Amso NN, Gregory L, Kipling D. 2006 :** Telomere instability in the male germline. *Hum Mol Genet.* 2006; 15:45–51. [PubMed: 16311252].
- **Balhorn R, 1982:** A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* **93**, 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—aposition report *Human Reproduction* **25** 824–838.

- **Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y.** Realtime fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. **J Androl** 2002;23(1):1-8.
- **Belloc S, Cohen-Bagrié P, Benkhalifa M 2008:** Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. **Reprod Biomed Online** 2008; 17: 392-397.
- **Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois Guerin J. 2007:** Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril.* 2007;87(1):93-100.
- **Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, et al.** The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 2005;20(1):185-90.
- **Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U and Sakkas D, 1993:** Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa *Biology of Reproduction* 49 1083–1088.
- **Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M and Hsueh AJ, 1995:** Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages *Endocrinology* 136 5–12.
- **Branco AC, Achour-Frydman N, Kadoch J, Fanchin R, Tachdjian G, Frydman R.** In vitro fertilization and embryo transfer in seminatural cycles for patients with ovarian aging. *Fertil Steril* 2006;84(4):875-77
- **Brewer LR, Corzett M and Balhorn R, 1999 :** Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science* 286, 120–123.
- **Brewer L, Corzett M, Lau EY and Balhorn R, 2003 :** Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. *J Biol Chem* 278, 42403–42408.
- **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.
- **Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, et al. Elevated, 2003:** sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol.* 2003; 101(6):1229-35.
- **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.

- **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.**
- **Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal. Arrêté du 12 janvier 1999 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en assistance médicale à la procréation. Journal Officiel 1999;28 février.**
- **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 1 binding to single DNA molecules. *J Biol Chem* **278**, 42403–42408.
- **Dada, R., Gupta, N.P., Kucheria, K., 2003:**Spermatogenic arrest in men with testicular hyperthermia. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **235–243.**
- **Das, M., Al-Hathal, N., San-Gabriel, M., Phillips, S., Kadoch, I.J., Bissonnette, F., Holzer, H., Zini, A., 2013:** High prevalence of isolated sperm DNA damage in infertile men with advanced paternal age. *J. Assist. Reprod. Genet.* **30**, 843–848.
- **De Krester, 2007:** D.M. *Endocrinology of the Male Reproductive System.* Chapter 1, 2007, Endotext.com.
- **Devroey P, Van Steirteghem A.** A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update* **2004**;10(1):19-28.
- 
- **Dupont C et al, 2013: Impact** of maternal hyperlipidichypercholesterolaemic diet on male reproductive organs and testosterone concentration in rabbits. *J Dev Orig Health Dis* 2014.
- **Hammiche, F., Laven, J.S., Boxmeer, J.C., Dohle, G.R., Steegers,E.A., Steegers-Theunissen, R.P., 2011:** Sperm quality decline among men below 60 years of age undergoing IVF or ICSI treatment. *J. Androl.* **32**, 70–76.
- **E. Blanc, P. Meria, O. Cussenot., 1998 :**Anatomie chirurgicale des organes génitaux masculins externes. *EMC Techniques chirurgicales – Urologie*, **41-390.**
- **Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR,1980a:** Relation of mammalian spermchromatin heterogeneity to fertility *Science* **210** 1131–1133.

- **Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR, 1980b:** Comparison of human and mouse sperm chromatin structure by flow cytometry *Chromosoma* **78** 225–238.
- **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.
- **Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, and Alvarez JG, 2003:** The sperm chromatin dispersion test: A simple method for the determination of sperm DNA fragmentation *Journal of Andrology* **24** 59 -66.
- **Ford WC, North K, Taylor H et al. 2000:** Increasing paternal age is associated with delayed conception in a large population of fertile couples: evidence for declining fecundity in older men. The ALSPAC Study Team (Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood). *Hum Reprod*, **2000**; **15**: **1703-1708**.
- **Foresta C, Moro E and Ferlin A, 2001:** Y chromosome microdeletions and alterations of Spermatogenesis *Endocrine Reviews* **22** 226–239.
- **Fullston Tet al, 2013:** Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB J* 2013.
- **Gibbons A. 2012:** American Association of Physical Anthropologists. Older dads have healthier kids than you think. *Science*. 2012; 336:539. [PubMed: 22556230].
- **Gil-Guzman, E., Ollero, M., Lopez, M.C., Sharma, R.K., Alvarez, J.G., Thomas Jr., A.J., Agarwal, A., 2001:** Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum. Reprod.* **16**, 1922–1930.
- **Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM and Zalensky AO, 2000:** Human spermtelomere-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.
- **Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H and Darzynkiewicz Z, 1993:** Presence of strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells *Experimental Cell Research* **207** 202–205.
- **Griveau JF.** Interest of pentixifylline in ICSI with frozen-thawed testicular spermatozoa from patients with nonobstructive azoospermia. *RBM Online* **2006**; **12**(1):14-8.



- **Gunby J., Bissonnette F., Librach C., Cowan L. 2009:** *Assisted reproductive technologies (ART in Canada: 2006 results from the Canadian ART Register*. Fertility and Sterility. 2009; Epub ahead of print.
- **Hammiche, F., Laven, J.S., Boxmeer, J.C., Dohle, G.R., Steegers, E.A., Steegers-Theunissen, R.P., 2011:** Sperm quality decline among men below 60 years of age undergoing IVF or ICSI treatment. *J. Androl.* **32**, 70–76.
- **Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J and Carrell DT 2009:** Cairns BR Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development *Nature* **460** 473–478.
- **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.
- **Hazout A, Menezo Y, Madelenat P, Yazbeck C, Selva J and Cohen-Bacrie P, 2008:** Causes and clinical implications of sperm DNA damages *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* **36** 1109–1117.
- **Hengstler, J.G., Bolm-Audorff, U., Faldum, A., Janssen, K., Reifenrath, M., Gotte, W., Jung, D., Mayer-Popken, O., Fuchs, J., Gebhard, S., Bienfait, H.G., Schlink, K., Dietrich, C., Faust, D., Epe, B., Oesch, F., 2003:** Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis* **24**, 63–73.
- **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.
- **Hughes C, Lewis S, McKelvey-Martin V and Thompson W, 1996:** A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay *Molecular Human Reproduction* **2** 613–619.
- **Hughes E.G. et Giacomini M. 2001:** *Funding in vitro fertilization treatment for persistent subfertility: the pain and the politics*. Fertility and Sterility. 2001; **76(3)**: 431–442.
- **Humeau C and Arnal F, 2005 :** Reproduction et développement. Editions sauramps médical. Pages **61-80**.
- **Ioannou D, Griffin DK. 2011:** Male fertility, chromosome abnormalities, and nuclear organization. *Cytogenet Genome Res.* 2011; **133**:269–79. [PubMed: 21088381].

- **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.
- **Jian Pei Ph., 2005:** Quantitative Evaluation of Spermatozoa Ultrastructure after Acupuncture Treatment for Idiopathic Male Infertility. *Fertility and Sterility*, **84(1)**:141-147.
- **JP Bailleul, B. Mauroy., (1991).** : Anatomie du testicule, des voies spermatiques et des bourses. EMC Urologie 18-600-A-10
- **Kaleli, S., Ocer, F., Irez, T., Budak, E., Aksu, M.F., 2000:** Does leukocytospermia associate with poor semen parameters and sperm functions in male infertility? The role of different seminal leukocyte concentrations. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.***89**, 185–191.
- **Keltz Jet al., 2010: Overweight** men: clinical pregnancy after ART is decreased in IVF but not in ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet*, 2010.
- **Kimura Y et Yanagimachi R, 1995:** Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* **121**, 2397–2405.
- **Kimura M, Cherkas LF, Kato BS, Demissie S, Hjelmberg JB, Brimacombe M, et al. 2008:**Off spring's leukocyte telomere length, paternal age, and telomere elongation in sperm. *PLoS Genet.* 2008; 4:e37. [PubMed: 18282113].
- **Kiziler, A.R., Aydemir, B., Onaran, I., Alici, B., Ozkara, H., Gulyasar, T., Akyolcu, M.C., 2007:** High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects. *Biol. Trace Elem. Res.* **120**, 82–91.
- **Kosower NS, Katayose H and Yanagimachi R, 1992:** Thiol-disulfide status and acridineorange 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.
- **Lanzafame, F.M., La Vignera, S., Vicari, E., Calogero, A.E., 2009 :**Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reprod. Biomed. Online* **19**, 638–659.
- **La Rochebrochard E, Thonneau P. 2003:** Paternal age >40 an important risk factor of infertility. *Am J Obstet Gynecol*, **2003**,189:901-905.

- **Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW 2nd, Greider CW, DePinho RA. 1998 :** Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature*. 1998; 392:569–74. [PubMed: 9560153].
- **Lee J, Richburg JH, Younkin SC and Boekelheide K,1997:** The Fas system is a keyregulator of germ cell apoptosis in the testis *Endocrinology* **138** 2081–2088.
- **Liu P.Y. etHandelsman D.J.2003:***The present and future state of hormonal treatment for maleinfertility*. Human Reproduction Update. 2003; 9(1): 9-23.
- **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.
- **Luger, K., Mader, AW., Richmond, RK., Sargent, DF. and Richmond, TJ. (1997).** Crystal structureof the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature* 389, 251-260.
- **Magnusdottir EVet al. 2005:** Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod* 2005.
- **Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U and Sakkas D, 1995:** Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and itsrelationship to chromomycin A3 accessibility *Biology of Reproduction* **52** 864–867.
- **Marcon L and Boissonneault G, 2004:** Transient DNA strand breaks during mouse and humanspermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling *Biologyof 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 duringmammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids *EuropeanJournal of Histochemistry***37** 109–128.
- **McPherson NOet al. 2013:** Improving metabolic health in obese male mice via diet and exercise restores embryo development and fetalgrowth. *PLoS One* 2013.

- **Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR and Zhao M, 2003:** Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111, 483–488.
- **Menkveld R, Holleboom CA, Rhemrev JP.2011:** Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J Androl.* **2011**; **13**(1):59-68.
- **Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. 2010:** Disruption of telomere-telomere interactions associated with DNA damage in human spermatozoa: systems biology in reproductive medicine. *2010*; **56**:407–12.
- **Morris ID, 2002b:** Sperm DNA damage and cancer treatment *International Journal of Andrology* **25** 255–261.
- **Ng S.F.et al. 2012:**Chronic high-fat diet in father's programs-cell dysfunction in female rat offspring. Nature, Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Hum Reprod* 2012.
- **Nieschlag E, Behre HM and Nieschlag S, 2010:***Andrology: Male reproductive health and Dysfunction*3rd Edn. Springer.
- **Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M.C., Sharma, R.K., Agarwal, A., Larson, K., Evenson, D., Thomas Jr., A.J., Alvarez, J.G., 2001:** Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum. Reprod.* **16**, 1912–1921.
- **Ombelet W, Wouters E, Boels L, Cox A, Janssen M, Spiessens C,et al. 1997:** Sperm morphology assessment:diagnostic potential and comparative analysis of strict or WHO criteria in a fertile and a subfertile population. *Int J Androl.* **1997**;**20**(6):**367-72**.
- **Omu, A.E., Al-Qattan, F., Al-Abdul-Hadi, F.M., Fatinikun, M.T.,Fernandes, S., 1999:**Seminal immune response in infertile men withleukocytospermia: effect on antioxidantactivity. *Eur. J.Obstet. Gynecol.: Reprod. Biol.* **86**, 195–202.
- **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.
- **Yaday, S.B., Suryakar, A.N., Huddedar, A.D., Shukla, P.S., 2006:** Effect of antioxidants and antibiotics on levels of seminal oxidative stress in leukocytospermic infertile men. *Indian J. Clin. Biochem.* **21**, 152–156.
- **Younglai EV, Holt D, BrownP, JurisicovaA, CasperRF.2001:** Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod.*2001; **16**(9):**1950-3**.

- **Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem AC, 1992:** Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte *Lancet* **340** 17–18.
- **Palermo GD , Neri QV, Cozzubbo T ,Rosenwaks Z.2014 :** perspectives on the assessment of human sperm chromatin integrity. *Fertil Steril*2014;102:1508-17.
- **Petersen G Let al. 2013 :** The influence of female and male body mass index on live births after assisted reproductive technology treatment; a nationwide register-based cohort study. *Fertil Steril* 2013.
- **Peterson C.L. 2000:** ATP-dependent chromatin remodeling: going mobile. *FEBS Lett.*, 2000, 476 : 68-72.
- **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 retroposition and foreign DNA integration. *Mol Reprod Dev* **56**, 248–251.
- **Prescott J, Du M, Wong JY, Han J, De Vivo I. 2012 :** Paternal age at birth is associated with offspring leukocyte telomere length in the nurses' health study. *Hum Reprod.* 2012; 27:3622–31. [PubMed:22940768].
- **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-hypophysogonadique. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée.* 2002; **18**: 35-40.
- **Rybar, R., Kopecka, V., Prinosilova, P., Markova, P., Rubes, J., 2011 :** Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia***43**, 286–291.
- **Rignell-Hydbom A, Rylander L, Giwercman A, Jonsson BA, Lindh C, Eleuteri P, Rescia M, Leter G, Cordelli E, Spano M and Hagmar L, 2005:** Exposure to PCBs and p,p'-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.
- **Roux C, Tripogney C, Joanne C and Bresson JL, 2004 :** Qualité nucléaire du spermatozoïde : tests d'exploration de la chromatine des spermatozoïdes humains (protéines nucléaires) *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* **32** 792–798.

- **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.
- **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.
- **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.
- **Santiso R, Tamayo M, Gosalvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernandez JL., 2010 :** Swim-up procedure selects spermatozoa with longer telomere length. *Mutat Res.* 2010; 688:88–90. [PubMed:20226199].
- **Sadeghi MR, Lakpour N, heidari-vala H, Hodjat M, Amirjannati N, Jadda HH, Binaafar Sand Akhondi MM, 2011:** Relationship between sperm chromatin status and ICSI outcome in men with obstructive azoospermia and unexplained infertile normozoospermia *Romanian Journal of Morphology & Embryology* **52** 645–651.
- **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.
- **Sakkas D and Tomolinson M, 2000:** Assessment of sperm competence *Seminars in reproductive Medicine* **18** 133–139.
- **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, Manicardi GC, Bianchi PG, Bizzaro D and Bianchi U, 1995:** Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa *Biology of Reproduction* **52** 1149–1155.
- **Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G and Campana A, 1996:** Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection *Human Reproduction* **11** 837–843.
- **Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y and Campana A, 1998:** Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development *Human Reproduction* **13 Supplement 4** 11-19.

- **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* **43**1–37.
- **Sakkas D, Seli E, Manicardi GC, Nijs M, Ombet W and Bizzaro D, 2004:** The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? *Human Fertility (Cambridge, England)* **7** 99–103.
- **Sergerie M, Bleau G, Teulé R, Daudin M and Bujan L, 2005:** Sperm DNA integrity as a diagnosis and prognosis element of male fertility *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* **33**89–101.
- **Sermondade Net al. 2012:** Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia. *Arch Intern Med* 2012.
- **Skakkebaek NE, 2002:** Endocrine disrupters and testicular dysgenesis syndrome *Hormone Research* **57** Supplement **2** 43.
- **Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A and Muller J, 1987:** Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma *International Journal of Andrology* **10** 19–28.
- **Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E and Main KM, 2001:** Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects *Human Reproduction* **16** 972–978.
- **Sotolongo B, Lino E and Ward WS (2003)** Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod* **69**, 2029–2035.
- **Soubry A et al. 2013:** Paternal obesity is associated with IGF2 hypomethylation in newborns: results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort. *BMC Med* 2013.
- **Spano M, Toft G, Hagmar L, Eleuteri P, Rescia M, Rignell-Hydbom A, Tyrkiel W, Zvyezday 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.
- **Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE and Bergmann M, 2000:** Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis *Molecular Human Reproduction* **6** 219–225.
- **Southorn, T., 2002:** Great balls of fire and the vicious cycle: a study of the effects of cycling on male fertility. *J. Fam. Plann. Reprod. Health Care* **28**, 211–213.

- **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.
- **Suganuma R, Yanagimachi R and Meistrich ML, 2005:** Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI *Human Reproduction* **20** 3101–3108.
- **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.
- **Tang SS, Gao H, Zhao Y, Ma S. 2010:** Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. *Int J Androl.* **2010**; **33**(1):e163-79.
- **Templeton A., 1995:** Infertility- epidemiology, aetiology 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.
- **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
- **Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, 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 Den Bergh M, Revelard P, Bertrand E, Biramane J, Vanin A-S and Englert Y, 1997:** Glass wool column filtration, an advantageous way of preparing semen samples for intracytoplasmic sperm injection: an auto-controlled randomized study *Human Reproduction* **12** 509–513.
- **Van Der Ven HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S, Tannerhoff 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.
- **Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E and Devroey P, 1993:** Higher success rates by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles *Human Reproduction* **8** 1055-1060.
- **Van Voorhis BJ and Sparks AE, 1999:** Semen analysis: What tests are clinically useful? *Clinical Obstetrics and gynecology* **42** 957– 971.



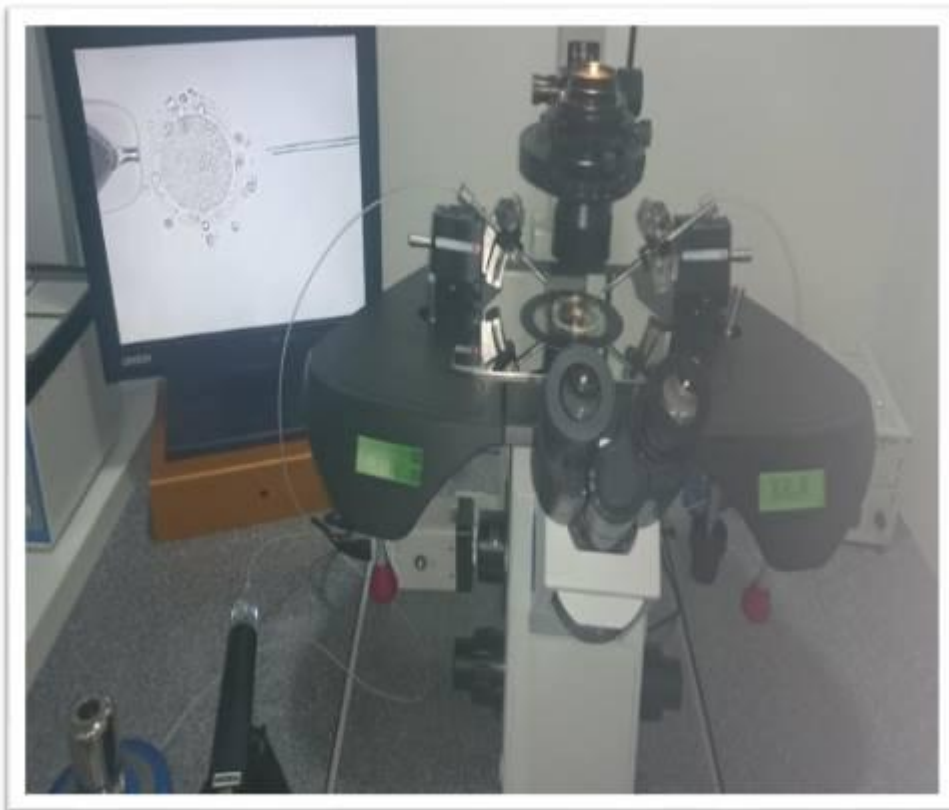
- **Vilfan ID, Conwell CC and Hud NV, 2004 :** Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *J Biol Chem* 279, 20088–20095.
- **Ward WS, 1993 :** Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 48, 1193–1201.
- **Ward 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.
- **Wei Yet al. 2014:** Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. *Proc Natl AcadSci U S A* 2014.
- **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., 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. *Fertil. Steril.* 74, 930–935.
- **World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.**
- **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.
- **Young SS, 2013:** The association of folate, zinc and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy non-smoking men. Elemental composition of human semen is associated with motility and genomic sperm defects among older men. *Hum Reprod* 2013.

- **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.
- **Zini A, Sigman M.** Are tests of sperm DNA damage clinically useful? **Pros and cons.** *J Androl.*2009; 30:219–29.
- **Zoran JR and Saval M, 1999 :** *Stérilité du couple* Masson, Paris *journal of Andrology*30 219–22.

**Annexe A:**poste de manipulation des gamètes et des embryons (photo originale)



**Annexe B:** microscope inversé de micro-injection (photo originale)



**Annexe C :**

- **Matériels et équipements**

- Microscope optique avec objectif x40 et x100 à immersion
- Etuve à 37°C
- Bain Marie
- Réfrigérateur
- Micropipette

- **Consommables et Réactifs pour la technique**

- Plaque métallique
- Lamelle 22x22
- Gants
- Eau distillée
- Ethanol 70% 90% 100%
- Colorant May-gunwald
- Colorant Giemsa

**Annexe D : Fiche du DFI.**

Date de prélèvement : .....	Heure : .....	/ salle de recueil : .....
Mr : .....	N° d'ordre : .....	
Date de naissance : .....	N° Dossier : .....	
Médecin : .....	Durée d'abstinence : ..... Jours	
N° tel : .....		

Taille : ..... Poids : ..... BMI : .....

**DFI (fragmentation d'ADN spermatique)**

Durée d'infertilité : .....

Maladies : ..... Heure d'Analyse : .....

Prise de médicaments : ..... Opérateur : .....

Interventions chirurgicales : ..... Lecture : .....

Prise de tabac et d'alcool : ..... Saisie et Impression : .....

Profession : ..... Date SPC-MYCO : .....

Episode de fièvre de grippe 3 mois : ..... Fréquence des rapports : .....

Motif :  Echecs répétés d'IUI  Echecs répétés d'ICSI  Mauvaise qualité embryonnaire

**Exame**     Avortement répétés     Varicocèle     Age > 45ANS     Autres

**Viscosité :** .....    **Couleur :** .....

**Examen microscopique:** .....    **Vitalité :** .....

- **Mobilité**    30min    Après sélection    Volume traité : .....    tech e sélection : .....
- (a) .....    .....    Gradient: ..... N° lot: ..... Date per: ..... Date ouv: .....
- (b) .....    .....    Lavage: ..... N° lot: ..... Date per: ..... Date ouv: .....
- (c) .....    .....    Kit DFI ..... N° Lot ..... Date per: ..... Date ouv: .....
- (d) .....    .....    .....

- **Concentration**    (Dil à .....) \* **Concentration après sélection** (Dil à .....)
- Spermatozoïdes = ...../ml    Spermatozoïdes = ...../ml
- Cellules rondes = ...../ml    Cellules rondes = ...../ml



**Analyse de la Fragmentation de l'ADN**    **Nombre**    **Pourcentage (%)**

<b>Spermatozoïdes sans fragmentation</b> N	Halo			
	Halo			
<b>Spermatozoïdes avec fragmentation</b> N	Halo			
	Non Halo			
	Non Halo			

**Observations :**

--

<b>DFI (Index fragmentation de l'ADN) :</b>	<b>%</b>
---	----------

## Annexe E : Fiche du Spermogramme.

### CENTRE D'ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION TIZIRI

01, Rue des frères  
El Biar, (16) Alger  
Tél : 021 90 70 54 /



Fax : 021 90 99 98

Nom :  
Prénom :  
Age :  
N° Dossier :

Date de prélèvement : /2016  
Lieu de prélèvement : Centre Tiziri  
Durée d'abstinence : jours  
Médecin prescripteur:

## SPERMOGRAMME

Volume : (N : >1.5 ml)      Couleur :      Agglomérat :  
Viscosité :      Floculat :      Agglutinats :  
PH : (N : 7.2-8)  
Spermatozoïdes      Concentration : million(s/ml (N : >=15 million/ml)  
Numération : million(s/éjaculat (N : >=40 million/éjaculat)

Cellules Rondes : million(s/ml (N : <=2 million/ml)

Leucoscreen : million(s/ml (N : <=1 million/ml)

té N: (a+b) >=32%		Centrifugation
et progressif (a)		
faiblement progressif (b)		
non progressif (c)		
ile (d)		

Sur 100 spermatozoïdes Vivants. (N : <= 58% )

## SPERMOCYTOGRAMME

Sur 100 spermatozoïdes observés, on a révélé formes typiques (N : > 15% : classification de David modifiée)  
Index d'anomalies multiples IAM : 1.45(N : <= 1.66)

### Têtes

Allongé :  
Amincie :  
Microcéphale :  
Macrocéphale :  
Tête multiples :  
Base anormale :  
Acrosome absent :  
Acrosome mal formé :

### Pièces intermédiaires Autres anomalies

Reste cytoplasmique :  
Grêle :  
Angulation :  
Flagelles Polynucléaires :  
Absent :  
Ecourté :  
Calibre irrégulier :  
Enroulé :  
Multiple :

Flagelle isolés :  
Spermatozoïdes en lyse :  
Cellules de la lignée germinale :  
Autre cellules :  
Fragments cellulaires :

**Conclusion :**

## Annexe E : Fiche technique PureSperm 100.

# eSperm® 100

### Application envisagée : résumé et explication

PureSperm100 est une suspension de silice colloïdale si est conçue pour la préparation de gradients de densité à techniques de reproduction assistée. Ce système assure celle des spermatozoaires, le sperme immature ou anormal, les défauts cellulaires, les bactéries et le liquide sérial.

est une solution saline isotonique. Elle élimine de sperme humain utilisé dans les techniques de reproduction assistée, les spermatozoaires normaux et les lymphocytes, les bactéries et le liquide sérial.

### Composants

Silice avec recouvrement de silice	Ions sodium
Ions calcium	Eau de qualité WFI
Ions chlorure	HEPES
Ions potassium	EDTA
	Glucose

### Caractéristiques

pH	7,4-7,8
Densité (nD20/20°C)	300-320
Niveau d'absorbance	<1,0 @100nm
Survie du sperme 18 heures après séparation par gradient de densité	>70 %

Le contenu est testé uniquement en fonction de la survie du sperme humain.

Les flacons et bouchons sont soumis à un test NIA sur 2 articles.

### Conservation et stabilité

Conserver les flacons fermés entre 2 et 40 °C, et éviter les températures en dehors de cette plage. Dans ces conditions, PureSperm100 a une durée de conservation de 24 mois. La date d'expiration est indiquée sur les flacons et les cartons.

Ouvrir et fermer les flacons dans des conditions aseptiques. Après ouverture, conserver entre 2 et 8 °C les flacons non utilisés. La durée de conservation sur l'étiquette est valable lorsque le produit est conservé conformément aux recommandations du fabricant.

Aucun antibiotique, additif instable ou conservateur n'a été ajouté par le fabricant à PureSperm100.

### Précautions et avertissements

- Lors de la récupération de la grenule de sperme, suivre les instructions figurant sur la notice du produit afin d'éviter toute contamination par inadvertance.
- Appliquez toujours des procédures aseptiques.
- Si des sacs scellés sont disponibles, les utiliser pendant la centrifugation pour éviter la cristallisation d'advent.
- Nettoyer les pertes accidentelles à l'aide d'un chiffon ou d'un papier humide. PureSperm100 rend les sols et les surfaces extrêmement glissants.
- PureSperm100 ne présente aucun risque d'incendie ou de combustion. Une fiche de données de sécurité peut être obtenue auprès du distributeur ou du fabricant (voir [nidacon.com](http://nidacon.com)).
- Ne pas utiliser de solution montrant une contamination bactérienne.
- Ne pas utiliser le contenu si le scellé prouvant l'intégrité est brisé.
- La Federal Law des Etats-Unis interdit la vente de ce dispositif aux médecins ou aux infirmières.
- Vérifier la légalité de l'utilisation des produits des techniques de reproduction assistée dans votre pays.

### Commandes

Volumé	N° article
100 ml	PS100-100
250 ml	PS100-250
1000 ml	PS100-1000



Pour de plus amples informations ou une aide, contactez votre distributeur ou le fabricant.



**Nidacon International AB**  
Höjersbergsgatan 16 B  
S-432 37 Mölndal  
Suède  
Tél : +46-31-703 06 30  
Fax : +46-31-48 54 15  
E-mail : [contact@nidacon.com](mailto:contact@nidacon.com)  
[www.nidacon.com](http://www.nidacon.com)



# Annexe F : Fiche technique FertiCult.

## FertiCult™ Flushing medium

Cell culture medium for washing of human ova, spermatozoa and embryos, for swim-up of spermatozoa, sperm injection in ICSI, zona ultrine penetration and embryo transfer

Document reference: FFC08 00 R01 0.2, Update: 20060901H



### USED ABBREVIATIONS

ICSI Intracytoplasmic Sperm Injection  
 zona ultrine penetration

### GENERAL INFORMATION AND INTENDED USE

FertiCult Flushing medium is a formulation for washing of human ova, spermatozoa and embryos. FertiCult Flushing medium can also be used for swim-up technique of human spermatozoa, sperm injection in ICSI and for embryo transfer. The medium is complete and needs no further additives. The medium contains HEPES, RO-CALCIUM is included. FertiCult Flushing medium does not contain Heparin, thus for needle pick-up, use FertiCult Aspirator medium. As with all IVF media, FertiCult Flushing medium ought to be preincubated in the incubator for 12 hours before use (with lid closed).

### COMPOSITION

FertiCult Flushing medium is a ready-to-use HEPES-buffered medium which also contains trace elements, physiological salts, glucose, lactate and human serum albumin (4.0g/liter). Gentamicin Sulphate can be added upon request (18 mg/liter).

### MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

Product code	Product description
FLUSH000	3 x 20ml of FertiCult Flushing medium
FLUSH020	100.0ml of FertiCult Flushing medium
FLUSH050	500ml of FertiCult Flushing medium
FLUSH100	1.000ml of FertiCult Flushing medium
FLUSH_000_PHR	100ml of FertiCult Flushing medium with Phenol Red
FLUSH000_PHR_G	3 x 20ml of FertiCult Flushing medium with Phenol Red and Gentamicin
FLUSH050_PHR	500ml of FertiCult Flushing medium with Phenol Red
FLUSH100_PHR	1.000ml of FertiCult Flushing medium with Phenol Red
FLUSH000_PHR_G	3 x 100ml of FertiCult Flushing medium with Phenol Red and Gentamicin
FLUSH050_PHR_G	1.000ml of FertiCult Flushing medium with Phenol Red and Gentamicin

### MATERIAL NOT INCLUDED WITH THE KIT

- Incubator at 37°C (5% CO<sub>2</sub>)
- Test dishes
- Microscope
- Test tubes
- LAF bench (ISO 5 environment)
- Syringe (e.g. 1ml Pasteur) or
- Catheter

### PRODUCT SPECIFICATIONS

- Chemical composition
- pH: between 7.20 - 7.50 (Release criteria)
- Osmolality: 270 - 280 mOsm/kg
- Stability: 6 months (SAL 30°)
- Endotoxins: < 0.25 EU/ml
- Mouse Embryo Assay (Eukaryotes after 50h culture): > 80% (48h exposure from zygote stage)
- Use of the Surge ISO grade products if applicable
- Certificate of analysis and MSCS are available upon request

### PRE-USE CHECKS

- Do not use the product if it becomes discoloured (if medium contains phenol red), cloudy, or shows any evidence of microbial contamination
- Do not use the product if seal of the container is opened or defected when the product is delivered

### STORAGE INSTRUCTIONS

- Store between 2-25°C, once opened store between 2-8°C
- Do not freeze before use
- Keep away from sunlight
- After opening the container do not use the product longer than 7 days
- Do not use after expiry date

### WARNINGS AND PRECAUTIONS

Standard measures to prevent infections resulting from the use of medicinal products prepared from human blood or plasma include selection of donors, screening of individual donations and plasma pools for specific markers of infection and the inclusion of effective manufacturing steps for the industrial removal of viruses. Despite this, when medicinal products prepared from human blood or plasma are administered, the possibility of transmitting infective agents cannot be totally excluded. This also applies to unknown or emerging viruses and other pathogens. There are no reports of proven virus transmissions with albumin manufactured to European Pharmacopoeia specifications by established processes. Therefore, handle all specimens as if capable of transmitting HIV or hepatitis.

Always wear protective clothing when handling specimens. Always work under strict hygienic conditions (ISO 5 environment, e.g. LAF-bench) to avoid possible contamination, even when FertiCult Flushing medium contains Gentamicin.

### METHOD

Washing of spermatozoa (proposed procedure)

- The washing of spermatozoa can be done at room temperature or at 37°C.
- Add 3 ml FertiCult Flushing medium to the native semen sample and mix. Centrifuge for 10 minutes at approximately 300g.
- Remove supernatant and leave about 0.5ml of semen in the centrifuge tube.
- Add 5ml FertiCult Flushing medium to the test-tube. Mix the solution gently until the pellet is completely dissolved.
- Centrifuge again for 10 minutes at 300g.
- Repeat the washing.

### Swim-up procedure (proposed ISO-MHCC, 2010)

- Fill the sperm sample (or sperm medium mix after performing "washing of spermatozoa" procedure) in a test-tube.
- Place 3ml of semen in a sterile 15ml conical centrifuge tube, and gently layer 1.2ml of FertiCult Flushing medium over it. Alternatively, pipette the semen carefully under the medium.
- Incline the tube at an angle of about 45°, to increase the surface area of the semen-culture medium interface, and incubate for 1 hour at 37°C.
- Openly return the tube to the upright position and remove the uppermost 1ml of medium. This will contain highly motile sperm cells.
- Discard this with 1.5x200ml of FertiCult Flushing medium.
- Centrifuge at 300-500g for 5 minutes and discard the supernatant.
- Resuspend the sperm pellet in 0.5ml of FertiCult Flushing medium.

### Zygote transfer (proposed ISO-MHCC, 2010)

- Take a sterile syringe, fill with FertiCult Flushing medium, and eject air bubbles. Attach the syringe to a catheter, and inject the medium.
- Draw up FertiCult Flushing medium into the syringe and push down the plunger to the 10µl calibration mark.
- Draw up the zygote(s) into the catheter so that the volume to be transferred is approximately 20-30µl.
- Insert catheter and syringe to the catheter for insertion and transfer in the uterus.

### BIBLIOGRAPHY

- WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th Edition, World Health Organization (2010).
- Shedden PRL (2000), Semen and Clinic Procedures and Protocols, A text book of in vitro fertilisation and assisted reproduction, 3rd edition, Taylor & Francis, Procedure No. 107.

FertiPro NV - Industriepark Noord 22 - 8730 Beersem  
Tel +32 (0)50 79 18 05 - Fax +32 (0)50 75 17 99  
URL: <http://www.fertipro.com> - E-mail: [info@fertipro.com](mailto:info@fertipro.com)

## FertiCult™ IVF medium

Cell culture medium for in vitro culture of human embryos, during the first 48 hours in culture

Document reference: FFC08 00 R04 0.2, Update: 01NOV2012



### GENERAL INFORMATION

FertiCult IVF medium is a ready-to-use formulation for the in vitro culture of mammalian embryos. It is designed for short term culture only (up to 48 hours in culture). The medium is complete and needs no further additives.

If preferred 10% patient serum (V-Cas) can be added. FertiCult IVF medium is suitable for micro-droplets (under oil or equally suited to culture in Falcon 3027 organ culture dishes (also 4-well Nunc culture dishes).

As with all IVF media, FertiCult IVF medium has to be pre-incubated in CO<sub>2</sub> incubator with 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours before use (with lid opened).

### MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

Product code	Product description
FCU0100	5 x 20ml FertiCult IVF medium
FCU0150	5 x 50ml FertiCult IVF medium
FCU0180	3 x 100ml FertiCult IVF medium
FCU020PHR	5 x 20ml FertiCult IVF medium w/ phenol red
FCU050PHR	5 x 50ml FertiCult IVF medium w/ phenol red
FCU100PHR	3 x 100ml FertiCult IVF medium w/ phenol red
FCU020PHR_G	5 x 20ml FertiCult IVF medium w/ phenol red and Gentamicin
FCU050PHR_G	5 x 50ml FertiCult IVF medium w/ phenol red and Gentamicin
FCU100PHR_G	3 x 100ml FertiCult IVF medium w/ phenol red and Gentamicin

### MATERIAL NOT INCLUDED WITH THE KIT

- Incubator at 37°C (5% CO<sub>2</sub>)
- Petri dishes (e.g. Falcon 3020)
- Mineral oil (e.g. FertiCult Mineral Oil)
- Laminar flow bench (ISO 5 environment)
- Microscope
- Test tubes

### PRODUCT SPECIFICATIONS

- Chemical composition
- pH: between 7.20 - 7.50 (37°C - 5% CO<sub>2</sub>)
- Osmolality: 270 - 280 mOsm/kg
- Stability: 6 months (SAL 10°)
- Endotoxins: < 0.25 EU/ml
- Mouse Embryo Assay (Eukaryotes after 50h culture): > 80% (48h exposure from zygote stage)
- Use of the Surge ISO grade raw materials if applicable
- Certificate of analysis and MSCS are available upon request

### PRE-USE CHECKS

- Do not use the product if it becomes discoloured (if medium contains phenol red), cloudy, or shows any evidence of microbial contamination
- Do not use the product if seal of the container is opened or defected when the product is delivered

### STORAGE AND CONSERVATION

- Store between 2-25°C, once opened store between 2-8°C
- Do not freeze before use
- Keep away from sunlight
- After opening the container do not use the product longer than 7 days
- Do not use after expiry date

### WARNINGS AND PRECAUTION

FertiCult IVF medium contains human serum albumin. Source materials from which this product was derived were found negative when tested for antibodies to HIV and HCV and were negative for HbsAg, HDV RNA, HCV RNA, HBV-1 DNA, and syphilis. No known test method can offer assurance that products derived from human blood will not transmit

infectious agents. Therefore, handle all specimens as if capable of transmitting HIV or hepatitis.

Always wear protective clothing when handling specimens. Always work under strict hygienic conditions (ISO 5 environment, e.g. LAF-bench) to avoid possible contamination, even when FertiCult IVF medium contains Gentamicin.

### METHOD

#### PREPARATION FOR USE OF MICRO-DROPLETS

For micro-droplets, between 100-250µl of FertiCult IVF medium may be dispensed across the culture dish, up to 5 per 60mm dish. The dish is then filled and pre-equilibrated (light mineral oil (sterile) and preferably embryo tested, e.g. FertiCult Mineral Oil).

One droplet is usually placed with about 10 000 sperm cells per micro-droplet so if you are expecting 15 embryos, at least two dishes per patient should be prepared. The dishes are then placed in the incubator (usually non-humidified) to equilibrate overnight at 37°C and under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. Overnight equilibration is highly recommended.

#### PREPARATION FOR USE OF OPEN SYSTEM

In open systems such as with the Falcon or Nunc dishes, about 1ml of medium is placed in each well.

A further 3ml is placed in the reservoir surrounding the wells. This helps to maintain humidity as well as providing medium with which to wash the oocytes and embryos.

Up to five oocytes per dish (or well if using Nunc dishes) may be cultured together, usually with about 100 000 sperm cells per well. So if each patient during the next day is expecting 15 oocytes at oocyte collection, at least six dishes per patient should be prepared (three for initial loading and cleaning of oocytes during collection and then three dishes for overnight culture).

When using Nunc dishes, two wells would be enough (since there are 4 wells per dish, the resulting 8 wells would be more than enough). The dishes are then placed in the incubator to equilibrate overnight at 37°C and under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air.

As with the micro-droplets method described above, equilibration overnight is highly recommended.

In the open system, paraffin oil is not necessary, but sometimes a 1ml layer of mineral oil may be added over the medium in the inner well. When using such an open system the incubator must be humidified.

**Culture:**  
After equilibration overnight, the prepared dishes are ready for use. During oocyte collection, oocytes are identified in the follicular aspirate and then washed before placing into the wells or droplets in the dish (as appropriate). Once oocyte collection is over, oocytes will be checked and may be transferred, before they being placed into fresh droplets/wells for overnight culture.

Generally, within 6 hours of oocyte collection, oocytes will be inseminated with prepared sperm and then left overnight in the incubator.

The procedure described above are for the first 26 hours of culture. Once embryos have been identified by the presence of two pro-nuclei, they are usually placed into fresh dishes containing fresh medium in the open system (people have used open system of patient oocytes, the initial medium contains 10% and the subsequent (after fertilisation has been confirmed), 15%).

When using FertiCult IVF medium no extra protein is required at changeover. Dishes should be prepared as described above, equilibrated overnight, after which they will be ready to receive the newly fertilised embryos.

**Tip:** Test tube culture is now rare, but for those still using this method, place 1ml of FertiCult IVF medium in each tube and then follow the same procedure as for Falcon or Nunc dishes.

FertiPro NV - Industriepark Noord 22 - 8730 Beersem,  
Belgium  
Tel +32 (0)50 79 18 05 - Fax +32 (0)50 75 17 99  
URL: <http://www.fertipro.com> - E-mail: [info@fertipro.com](mailto:info@fertipro.com)