

**Etude de la valeur prédictive de la fragmentation
de l'ADN spermatique pour le succès de la
fécondation *in vitro*
par microinjection intracytoplasmique de
spermatozoïde**

Sommaire

Liste des figures	VII
Liste des tableaux	IX
Liste des abréviations	X
Introduction	01

Partie théorique

Chapitre I. Rappel anatomophysiologique sur l'appareil reproducteur de l'homme et de la femme

1. Appareil génital masculin.....	5
2. Appareil génital féminin.....	6
3. Le cycle hormonal de la femme.....	8

Chapitre II. Stérilités féminines

1. Anomalies du vagin.....	10
2. Anomalies du cervix.....	10
3. Anomalies du l'utérus.....	10
4. Anomalies des trompes de Fallope.....	12
5. Anomalies des ovaires.....	13
6. Endométriose.....	14
7. Les avortements spontanés à répétition (ASR).....	15
8. Infertilité non expliquée.....	15

Chapitre III. Stérilités masculines

1. Anomalies de l'éjaculation.....	18
2. Cause immunologique.....	18
3. Anomalies isolées du plasma séminal.....	19
4. Causes systémiques.....	19
5. Causes toxiques.....	20
6. Anomalies congénitales.....	20
7. Dommages testiculaires acquis.....	20
8. Infection de glandes accessoires masculines.....	21
9. Varicocèle.....	21
10. Causes endocrines.....	21

11. Causes iatrogéniques.....	22
12. Anomalies non expliquées du sperme.....	22

Chapitre IV. L'ADN spermatique

1. Structure de la chromatine spermatique.....	25
2. Fragmentation de l'ADN spermatique.....	28
3. Les tests de fragmentation d'ADN.....	32

Chapitre V. Injection intracytoplasmique des spermatozoïdes (ICSI)

1. Définition de l'ICSI.....	40
2. Indications de l'ICSI.....	40
3. Technique de l'ICSI.....	41
4. Diagnostic et surveillance de la grossesse au début.....	50
5. Méthodes d'évaluation de la viabilité des pré-embryons.....	50

Partie pratique

Chapitre VI. Patients, matériels et méthodes et analyse statistique

1. Patients, matériels et méthodes	56
1.1. Patients.....	56
1.2. Prélèvement du sperme.....	56
1.3. Préparation du sperme par la centrifugation par gradient de densité.....	56
1.4. Analyse des paramètres standards de sperme.....	57
1.5. Procédure de l'injection intracytoplasmique des spermatozoïdes (ICSI).....	57
1.6. Evaluation de la fécondation et qualité des embryons.....	58
1.7. Phase lutéale et teste de grossesse.....	59
1.8. Test de fragmentation de l'ADN spermatique par SCD.....	59
2. Analyse statistique.....	65

Chapitre VII. Résultats et Discussion

1. Caractéristiques générales des couples étudiés.....	68
2. Indice de fragmentation d'ADN spermatique (IFA).....	69
3. Etude de l'influence de l'âge des hommes sur l'IFA.....	71
4. Comparaison du nombre d'antécédents de recours à une technique de PMA selon l'IFA.....	73
5. Etude de l'influence du tabagisme des hommes sur l'IFA.....	74
6. Etude de la relation entre l'IFA et différents paramètres standard du sperme.....	76
7. Etude de la valeur prédictive de l'IFA.....	82

8. Etude de l'effet de l'âge des femmes.....	91
Conclusions et perspectives.....	94
Références bibliographiques.....	97

Annexes

Annexe 1. Fiche technique de PureSperm® 100.....	116
Annexe 2. Fiche technique de FertiCult™ Flushing medium.....	118
Annexe 3. Fiche technique FertiCult™ IVF medium.....	119
Annexe 4. Fiche technique de Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium.....	120
Annexe 5. Fiche technique de 10 % PVP in FertiCult Flushing Medium.....	121
Annexe 6. Fiche technique de FertiCult Miniral Oil.....	122
Annexe 7. Chambre de Makler.....	124
Annexe 8. Microscope à contraste de phase.....	124
Annexe 9. Placement des gouttelettes de milieu de culture des ovocytes et de milieu visqueux PVP.....	125
Annexe 10. Questionnaire aux couples candidats à l'ICSI.....	126
Glossaire.....	128

Liste des figures

Figure I.1. L'appareil génital de l'homme.....	5
Figure I.2. L'appareil génital de la femme.....	7
Figure I.3. Les cycles menstruel et ovarien.....	8
Figure II.1. Fibromes utérins et déformation de la cavité utérine.....	11
Figure II.2. Hydrosalpinxes bilatéraux.....	12
Figure II.3. Échographie Transvaginale montrant un ovaire polykystique.....	13
Figure II.4 : Emplacements d'endométriose dans le bassin.....	15
Figure IV.1. Modèle d'organisation de noyau spermatique des mammifères.....	26
Figure IV.2. Protamination de l'ADN spermatique selon le model de cote à cote.....	27
Figure IV.3. Le rôle de Fas pendant la spermatogenèse.....	29
Figure IV.4. Test TUNEL.....	34
Figure IV.5. Test Comète.....	35
Figure IV.6. Comparaison des taux de FAS par le SCD et le TUNEL ou SCSA.....	38
Figure V.1. Microscope de Nikon Diaphot.....	48
Figure V.2. Vue supérieure proche d'une partie du microscope.....	48
Figure V.3. Injection d'un spermatozoïde mobile dans le cytoplasme ovocytaire.....	49
Figure V.4. Photomicrographes des ovocytes fécondés et des pré-embryons.....	51
Figure VI.1. Fluidification du gel.....	59
Figure VI.2. Equilibration de la température.....	60
Figure VI.3. Mélange sperme-gel.....	60
Figure VI.4. Etalement de la suspension cellulaire.....	61
Figure VI.5. Glissement de lamelle verticalement.....	61
Figure VI.6. La dénaturation.....	62
Figure VI.7. La lyse.....	62

Figure VI.8. Le rinçage.....	63
Figure VI.9. Fixation par l'alcool.....	63
Figure VI.10. Coloration Diff-Quik.....	64
Figure VI.11. Microscope photonique à fond claire (MOTIC B1 Series).....	64
Figure VII.1. Spermatozoïdes traités et colorés par l'Halosperm®	70
Figure VII.2. Corrélation de l'IFA avec l'âge des hommes.....	71
Figure VII.3. Comparaison des moyennes de la numération des spermatozoïdes selon l'IFA	76

Liste des tableaux

Tableau IV.1. Avantages et inconvénients de diverses analyses d'intégrité d'ADN.....	37
Tableau V.1. Indications pour l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes.....	41
Tableau VI.1. Classification des embryons suivie par la clinique Ibn Rochd.....	59
Tableau VII.1. Caractéristiques générales des couples étudiés, du sperme, de la FAS, et des résultats de l'ICSI.....	68

Liste des abréviations

8OHdG	8-hydroxy, 20-deoxyguanosine
AD	ADN dénaturé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	ADN double brin
ADNsb	ADN simple brin
ATCD	Antécédents
AO	Acridine orange
BA	Bleu d'Aniline
BT	Bleu de Toluidine
CGD	Centrifugation par gradient de densité
CMA3	Chromomycine A3
DAPI	49,6-diamidino-2-phenylindole
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
ADNsb	ADN simple brin
DTT	Dithiothréitol
d-UTP	2'-deoxyuridine, 5'-triphosphate
Fas	Apoptosis stimulating fragment
FasL	Ligand de Fas
FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
FSH	Follicle-stimulating hormone
g	Gramme
GB	Grossesse biochimique
GC	Grossesse clinique
GH	Growth hormone
GnRH	Gonadotrophine releasing hormone

GnRH_a	Gonadotrophine releasing hormone agonists
hCG	Human chorionic gonadotropin
HDS	High DNA stainability
IAC	Insimination artificielle avec conjoint
IAGM	Infection de Glandes Accessoires Masculines
IC	Intervalle de confiance
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection
IFA	L'indice de fragmentation d'ADN
IgA	Immunoglobuline A
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
Kb	Kilo base
LH	Luteinizing hormone
MARs	Matrix Attachments regions
MESA	Microsurgical epididymal sperm aspiration
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mn	Minute
NA-DNA	Nuclear annulus- Desoxyribonucleotid Acid
nm	Nanomètre
NP- 40	Nonyl phenoxyethoxyethanol
NT	Nick translation
OAT	Oligoasthénotéatospermie
OHSS	Ovarian hyper stimulation syndrome
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P1	Protamine 1

P2	Protamine 2
PCBs	Polychlorobiphényles
PCO	Polycystic ovarian
PESA	Percutaneous epididymal sperm aspiration
pH	Puissance d'Hydrogène
PID	Pelvic inflammatory disease
PMA	Procréation médicalement assistée
POF	Premature ovarian failure
PRG	Pertes répétitives de grossesse
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RC	Risque de cote
ROS	Reactive oxygen species
S	Synthèse
SCD	Sperm chromatin dispersion
SCSA	Sperm chromatin structure assay
SDS	Sulfate de dodécyl de sodium
SEM	Standard error of the mean
SPZ	Spermatozoïdes
TdT	Désoxynucléotidyle transférase
TESE	Testicular sperm extraction
Topo II	Topoisomérase II
TPE	Tube eppendorf
TUNEL	Terminal Uridine Nick-End labeling

Introduction

La gestion de la stérilité des couples a connu des progrès énormes surtout depuis le développement de la technique de fécondation *in vitro* (FIV) par les docteurs Patrick Steptoe et Robert Geoffrey Edwards en 1978. En effet, la FIV n'était qu'un premier pas dans le développement de la technique d'ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) qui a bouleversé le traitement des couples stériles étant donné qu'elle a pu résoudre partiellement les problèmes liés à l'infertilité masculine.

L'ICSI, avant sa pratique, exige une parfaite identification des paramètres spermatiques. Pendant plus de vingt-cinq ans, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a servi à fournir une approche normalisée à l'évaluation du potentiel de fertilité de l'échantillon de sperme (Rizk *et al.*, 2008). Ces normes concernent des paramètres mesurables tels que les propriétés physiques d'un éjaculat, estimation du nombre de son contenu cellulaire, que ce soit les spermatozoïdes ou les leucocytes, évaluation de la morphologie et de la mobilité de spermatozoïdes, et recherche d'une réaction immunitaire possible entre les spermatozoïdes et le contenu du plasma séminal ou le mucus préovulatoire produit par le col utérin (Rizk *et al.*, 2008). Néanmoins, l'analyse classique du sperme ne peut pas couvrir les divers volets des propriétés biologiques que le spermatozoïde possède en tant qu'une cellule hautement spécialisée (Zini *et al.*, 2001b ; Evenson *et al.*, 2002). En plus, pour qu'un test soit utile, il doit avoir un seuil qui fournira des possibilités discriminatoires et prédictives, avec peu de chevauchement entre les hommes fertiles et stériles; les paramètres conventionnels du sperme souvent ne possèdent pas un tel seuil (Evenson *et al.*, 2002), par conséquent la valeur prédictive de ces mesures est limitée bien que du progrès ait été accompli ces dernières années par l'introduction des techniques normalisées : automatisation des évaluations de motilité et organisation des systèmes d'assurance de qualité pour l'analyse du sperme (Van Voorhis and Sparks, 1999; Oehninger *et al.*, 2000; Sakkas and Tomolinson, 2000). Bien que ces analyses puissent décrire quelques aspects de la fonction des testicules et des spermatozoïdes, elles n'informent pas sur l'intégrité du génome masculin contenu dans la tête spermatique (Morris *et al.*, 2002a).

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 normal du zygote (Barratt *et al.*, 2010).

L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet de la fragmentation de l'ADN spermatique (FAS) sur les résultats de l'ICSI, autrement dit : quelle est la valeur prédictive de la fragmentation de l'ADN spermatique pour le succès de l'ICSI en utilisant le test de dispersion de chromatine ou SCD (Sperm Chromatin Dispersion) ?

Cette étude essaye d'autre part d'identifier la nature de la relation entre la FAS et les autres paramètres standard du sperme ainsi que d'autres paramètres tels que l'âge et le tabagisme et l'influence de l'âge de la femme sur les résultats d'ICSI selon le taux de FAS.

Partie théorique

Chapitre I

Rappel anatomophysiologique sur l'appareil reproducteur de l'homme et de la femme

1. Appareil génital masculin

1.1. Les testicules

Gonades males productrices de spermatozoïdes (Marieb *et al.*, 1999). Les testicules sont enveloppés dans un sac de peau, *scrotum* (Van de Graff and Rhees, 2002), (figure I.1). Chaque testicule est recouvert de deux couches de tissu ; la *tunique vaginale* externe et la *tunique albuginée* interne (Van de Graff and 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 (Marieb *et al.*, 1999). Les tubules séminifères contournés de chaque lobule convergent vers un tubule séminifère droit qui transporte les spermatozoïdes jusqu'au *rete testis* (Marieb *et al.*, 1999).

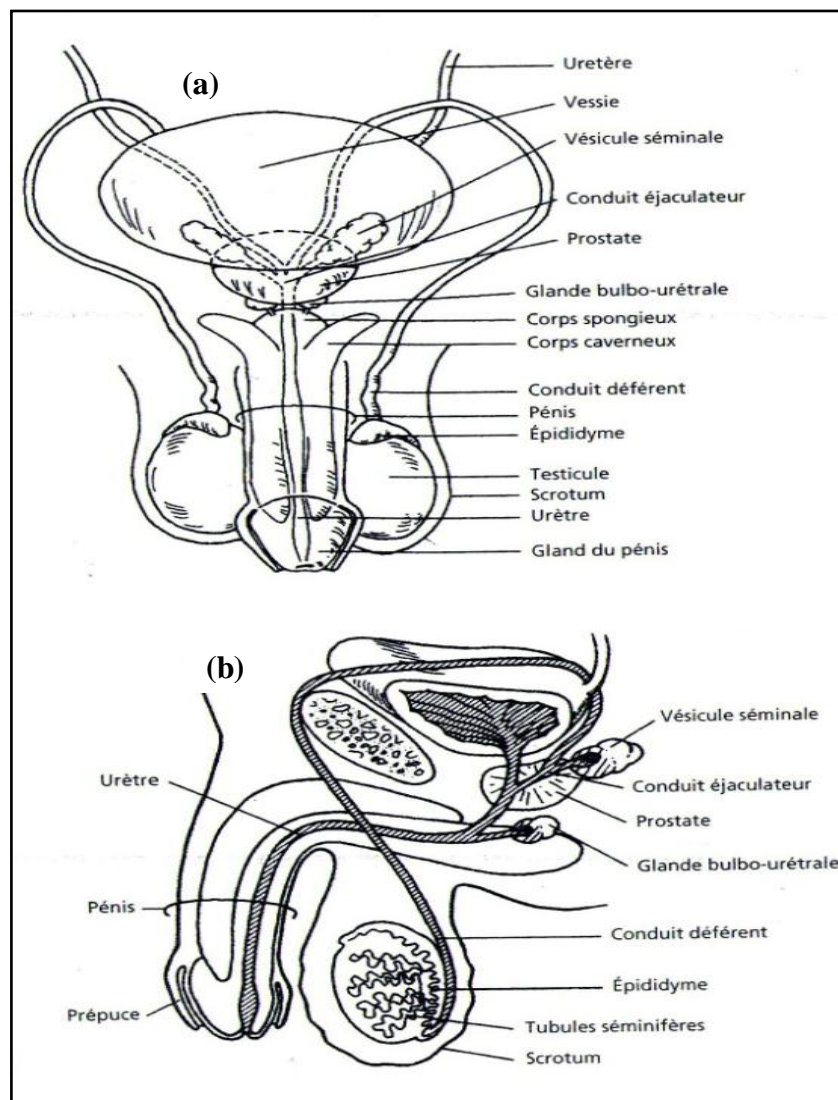


Figure I.1. Le système génital de l'homme. (a) Vue antérieure. (b) Coupe sagittale (Van de Graff and Rhees, 2002).

1.2. Les voies génitales de l'homme

1.2.1. 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).

1.2.2. Les canaux spermatiques et les glandes annexes

Pendant l'éjaculation, les spermatozoïdes matures passent par une série de canaux. Ils passent du *canal déférent* au *canal éjaculateur* où ils sont mélangés aux sécrétions de la *vésicule séminale*. Ils passent ensuite dans l'*urètre prostatique* qui reçoit les sécrétions de la *prostate*. Ils sont transportés ensuite dans l'*urètre membraneux* puis *spongieux*, dans le pénis. Les *glandes bulbo-urétrales* sont des glandes annexes situées à la base du pénis. Les glandes annexes produisent des sécrétions alcalines qui participent à la formation du sperme. Ces sécrétions ont un rôle nourricier, activent la mobilité des spermatozoïdes et leur caractère alcalin leur permet de neutraliser l'environnement acide de l'urètre et du vagin (Van de Graff and Rhees, 2002).

1.2.3. 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, permettant la pénétration du pénis dans le vagin pendant les rapports sexuels (Van de Graff and Rhees, 2002).

2. Appareil génital féminin

2.1. Les ovaires

Les ovaires sont des organes pairs situés de part et d'autre de l'utérus. Les *follicules* sont des petites structures sacciformes enfouies dans le tissu conjonctif très vascularisé du cortex de l'ovaire (Marieb *et al.*, 1999) (figure I.2).

2.2. L'utérus et les trompes utérines

Les trompes utérines s'étendent des ovaires jusqu'à l'utérus. Elles transportent l'ovocyte jusqu'à l'utérus où ont lieu la fécondation le développement de l'œuf (division de l'œuf et formation de la blastula). L'utérus est également le site d'implantation de l'œuf et du développement embryonnaire et fœtal. Les différentes parties de l'utérus sont : le *fond*, le *corps* et le *col*.

Les trois couches de la paroi utérine sont :

le périmétrium : couche externe ;

le myomètre : couche musculaire épaisse ;

l'endomètre : couche muqueuse interne (Van de Graff and Rhees, 2002).

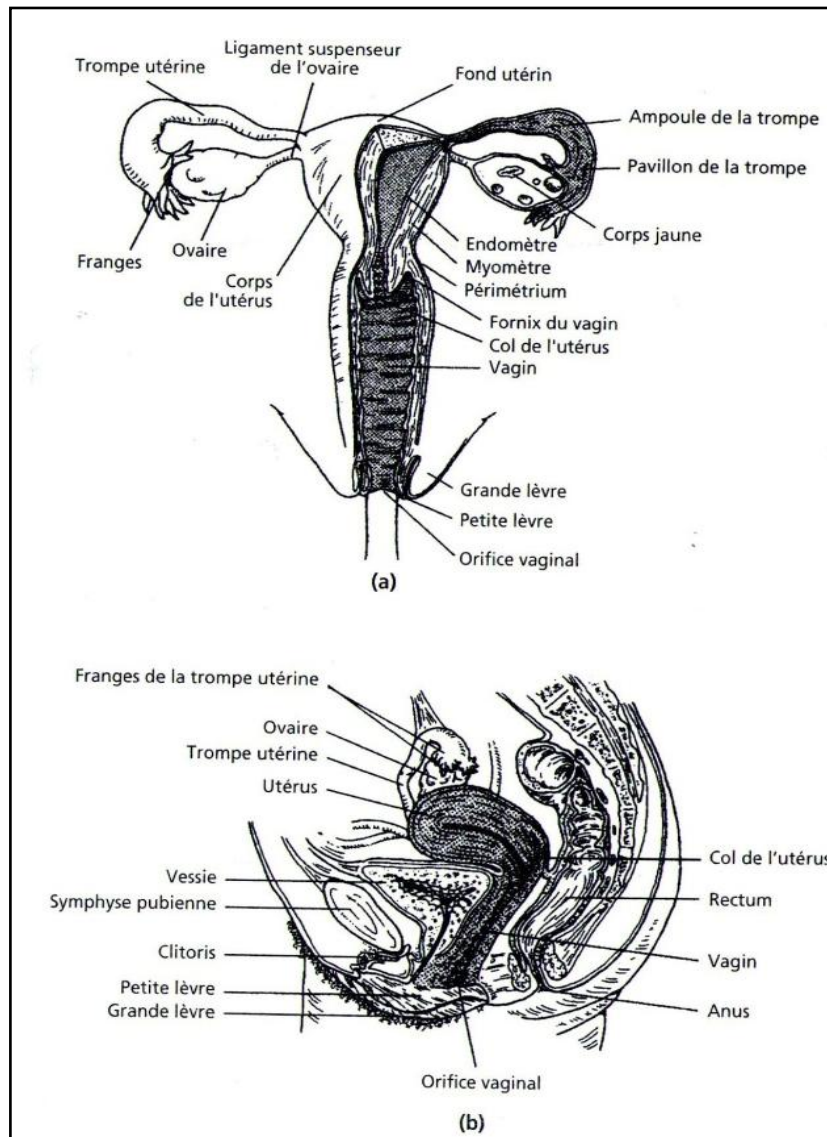


Figure I.2. Le système génital de la femme. (a) Vue antérieure. (b) Coupe sagittale (Van de Graff and Rhees, 2002).

2.3. Le vagin

Le vagin s'étend du col de l'utérus jusqu'à l'orifice vaginal au niveau des organes génitaux externes. Il reçoit le pénis en érection et le sperme pendant les rapports sexuels (Van de Graff and Rhees, 2002).

2.4. Les organes génitaux externes

Les organes génitaux externes sont le *mont du pubis* ou *mont de Vénus*, les *grandes lèvres*, les *petites lèvres*, le *clitoris*, et l'*orifice vaginal* (Van de Graff and Rhees, 2002).

3. Le cycle hormonal de la femme

La production des hormones stéroïdes par l'adénohypophyse et par les ovaires, est contrôlée par l'hypothalamus. Des changements cycliques dans la sécrétion de ces hormones régulent les activités de la reproduction chez la femme (figure I.3).

- 1) L'hypothalamus sécrète la gonadolibérine (LH-RH) ; l'organe cible est l'adénohypophyse.
- 2) LH-RH stimule la sécrétion de l'hormone folliculostimulante (FSH) et de l'hormone lutéinisante (LH), qui stimulent le développement des follicules ovariens (cycle ovarien).
- 3) Le follicule ovarien mature sécrète des œstrogènes qui provoquent l'épaississement de l'endomètre (phase proliférative du cycle menstruel, du cinquième jour à l'ovulation).
- 4) Après l'ovulation, le *corps jaune* sécrète des œstrogènes et de la progestérone, qui préparent l'endomètre à l'implantation de l'œuf (phase sécrétoire du cycle menstruel, de l'ovulation au vingt-huitième jour).
- 5) Le corps jaune qui dégénère forme le *corpus albicans*. Les taux d'œstrogènes et de progestérone chutent brutalement, l'endomètre est dégradé et un nouveau cycle menstruel commence (phase menstruelle du cycle menstruel) (Van de Graff and Rhees, 2002).

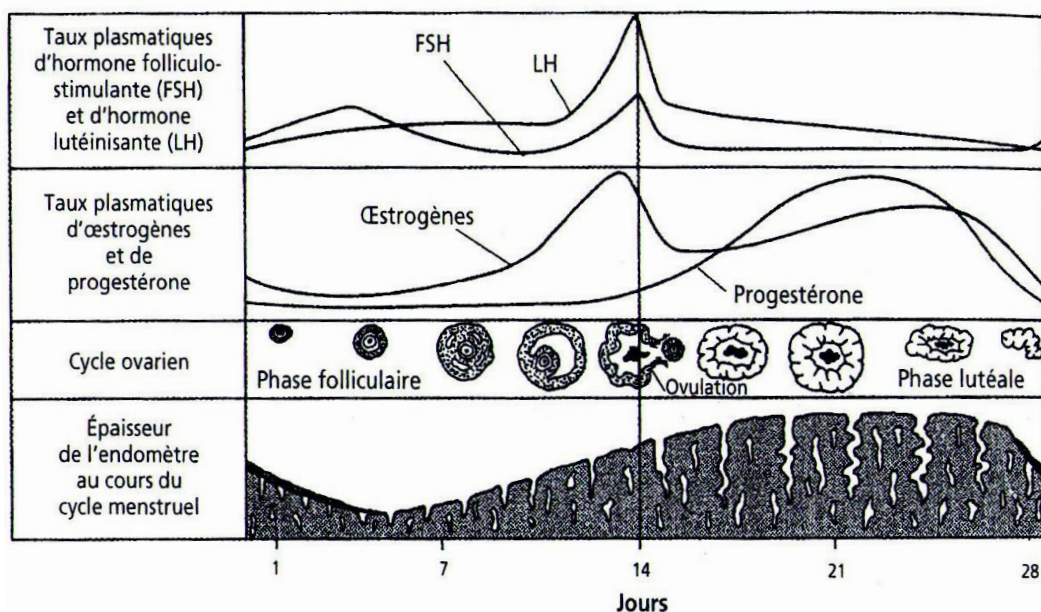


Figure I.3. Les cycles menstruel et ovarien (Van de Graff and Rhees, 2002).

Chapitre II

Stérilités féminines

Les problèmes féminins, seuls ou en combinaison avec les problèmes masculins, sont présents dans environ 50% des couples stériles. Ces problèmes de facteurs féminins surviennent après perturbation de la fonction des organes génitaux féminins (Godwin, 2004).

1. Anomalies du vagin

Le vaginisme est le spasme involontaire récurrent ou persistant de la musculature du tiers externe du vagin qui interfère la pénétration vaginale (Scott *et al.*, 2003).

2. Anomalies du cervix

Le cervix peut causer ou contribuer à l'infertilité par différentes manières. La qualité du mucus qui est produit au milieu du cycle, juste avant l'ovulation, peut être mauvaise. Par exemple, au lieu d'être mince, aqueuse, claire et étirable, elle peut être épaisse et forme un bouchon à l'os extérieur empêchant l'entrée des spermatozoïdes dans le canal cervical. Chez certaines patientes, il peut y avoir peu ou pas de production de mucus à cause d'une opération antérieure sur le cervix. Parfois le mucus cervical semble normal au milieu de cycle mais après l'analyse s'avère contenir des anticorps anti-spermatozoïdes. De plus, l'exposition longue des glandes cervicales à l'infection peut mener à la présence d'un grand nombre de globules blancs dans le mucus. Ceux-ci peuvent englober les spermatozoïdes ou produire des composés chimiques qui leur sont toxiques. Le mucus cervical serait hostile s'il est acide, (Godwin, 2004).

3. Anomalies de l'utérus

3.1. Fibromes

Les fibromes utérins sont des tumeurs de muscle lisse de l'utérus. Le léiomyome est un terme plus scientifique pour le fibrome (Godwin, 2004). Le léiomyome peut se trouver n'importe où dans le myomètre et peut être unique ou multiple (Scott *et al.*, 2003).

Dans de rares cas, il peut y avoir des fibromes bloquant le point d'entrée des deux trompes de Fallope dans la cavité utérine. Les tailles des fibromes varient. Quand l'utérus contient plusieurs ou de grands fibromes, la cavité utérine est susceptible de devenir tordue et des conditions hostiles existent telles que la conception devient difficile (figure II.1) (Godwin, 2004).

Les chercheurs pensent que les myomes interfèrent avec la contractilité utérine normale et le transport des gamètes et puissent changer le flux sanguin endométrial, menant à l'atrophie ou l'ulcération et la diminution de l'incidence de l'implantation (Vollenhoven *et al.*, 1990; Deligdish and Lowenthal, 1970; Settladge *et al.*, 1972; Iosif and Akerland, 1983).

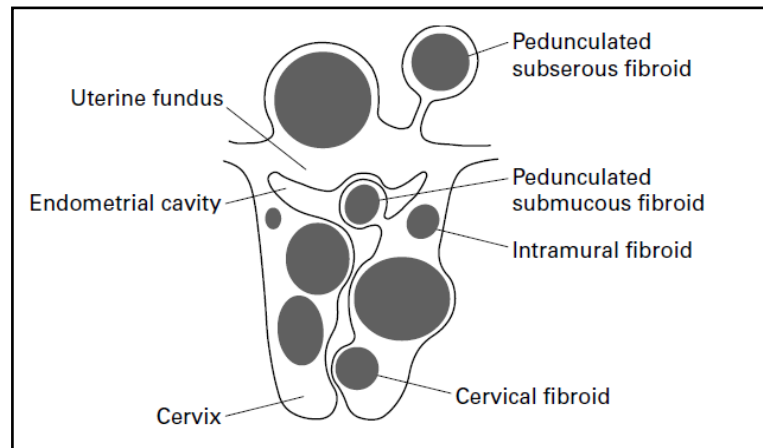


Figure II.1. Fibromes utérins et déformation de la cavité utérine (Godwin, 2004).

3.2. Endométrite

L'endométrite est une inflammation de l'endomètre et peut résulter d'une infection avec des organismes tels que les bactéries de tuberculose.

L'infertilité peut surgir par les effets des toxines produites par les bactéries et les sécrétions anormales à partir des glandes endométriales infectées (Godwin, 2004).

3.3. Le syndrome d'Asherman

Les adhérences intra-utérines ou les synéchies (syndrome d'Asherman) peuvent se développer quand les surfaces endométriales opposées sont endommagées et qui se cicatrisent comme une adhérence fusionnée. Ceci se produit typiquement quand une inflammation ou une infection persiste après avortement spontané du premier trimestre et quand la production d'œstrogènes est faible. Les patientes qui ont eu des curetages puerpéraux retardés pour les fragments placentaires maintenus, sont à haut risque pour le développement du syndrome d'Asherman.

Dans le post-partum, les œstrogènes d'origine placentaire sont métabolisés rapidement et l'inhibition ovarienne continue pendant plusieurs semaines. En l'absence de l'œstrogène, l'endomètre ne proliférera pas (Scott *et al.*, 2003).

L'implantation de l'embryon est empêchée chez ces patientes parce qu'il y a peu ou pas d'endomètre qui reste (Godwin, 2004).

3.4. Malformations utérines

Ces femmes peuvent avoir des problèmes avec leurs menstruations qui sont alors trop ou peu abondantes ou irrégulières, ou il peut ne pas y a une communication entre la cavité utérine et le vagin pour permettre à la perte menstruelle de s'écouler.

Si ces femmes deviennent enceintes, elles peuvent avoir des problèmes tels que des avortements répétés ou des naissances prématurées répétées (Godwin, 2004).

4. Anomalies des trompes de Fallope

L'infection dans les voies génitales inférieures (vagin et cervix) peut se propager vers les trompes causant alors une **salpingite**. L'infection de n'importe quel point dans la partie inférieure de l'abdomen et le bassin, particulièrement l'appendice lors d'une appendicite, peut également poser des problèmes de fertilité (Godwin, 2004). Il existe un autre nom donné pour l'infection dans le bassin qui est les maladies inflammatoires pelvienne (ou PID pour pelvic inflammatory disease).

Les études sur la prédominance des *Chlamydia trachomatis* dans les patientes présentant une PID prouvée ont montré que plus que la moitié des cas de PID sont provoqués par des *C. trachomatis* (Rizk et al., 2008). D'autres micro-organismes infectieux connus pour causer la salpingite sont *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycobacterium tuberculosis*, et des anaérobies endogènes (Keel et al., 2000).

L'obstruction des trompes peut se manifester suivant une PID particulièrement si l'infection n'est pas traitée rapidement ou n'est pas éradiquée complètement. Si l'obstruction est à l'extrémité fimbriqué de la trompe, les sécrétions peuvent s'accumuler dans la trompe faisant obstruée l'extrémité de cette dernière en se gonflant et formant ce qui est connu par l'**hydrosalpinx** (figure II.2) (Godwin, 2004).

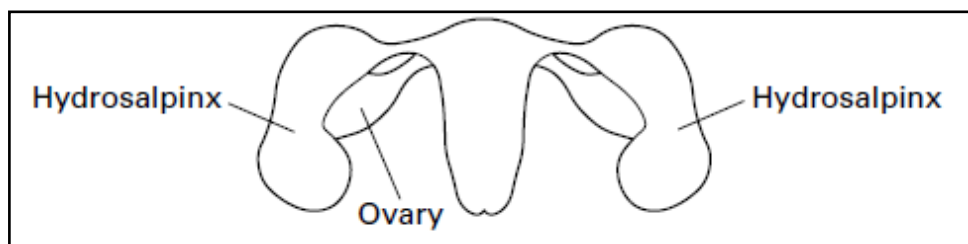


Figure II.2. Hydrosalpinxes bilatéraux (Godwin, 2004).

5. Anomalies des ovaires

5.1. Insuffisance ovarienne prématurée

L'insuffisance ovarienne prématurée (POF pour Premature ovarian failure) est une entité unique dans laquelle une femme subit des changements semblables à la ménopause, telle que l'aménorrhée, les niveaux élevés de FSH, et l'épuisement des follicules ovariens, avant l'âge de 40 ans (Scott *et al.*, 2003).

5.2. Hypogonadisme Hypogonadotrophique

Il s'agit d'un ensemble de troubles ayant en commun un manque ou une production déficiente de gonadolibérine (GnRH) ou l'hormone folliculostimuline (FSH) ou encor l'hormone lutéinisante (LH) (Godwin, 2004).

5.3. Syndrome d'ovaire polykystique

C'est une condition dans laquelle il y a plusieurs kystes minuscules dans les ovaires (figure II.3). Les ovaires tendent à être plus grands que la normale. Ces kystes ne ressemblent pas aux kystes qui se développent en tant que tumeurs ovariens. Ce sont les follicules ovariens qui n'accomplissent pas leur développement apparemment du fait des niveaux relativement bas de FSH (Godwin, 2004).

Ces patientes ont une irrégularité menstruelle causée par l'oligoovulation ou l'anovulation. Elles peuvent avoir des signes d'hypérandrogénisme, d'obésité, et d'infertilité secondaire à l'anovulation (Keel *et al.*, 2000).

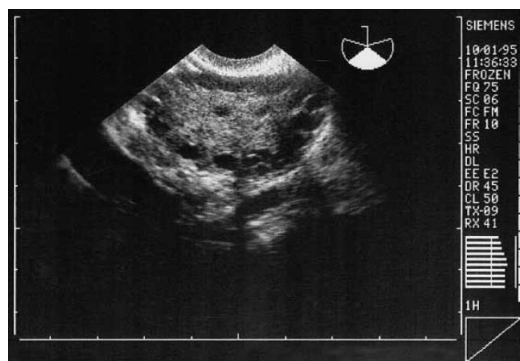


Figure II.3. Échographie transvaginale montrant un ovaire polykystique. Des kystes folliculaires nombreux sont arrangés autour de la périphérie de l'ovaire donnant un aspect typique d'un 'collier' (Godwin, 2004).

5.4. Perte de poids

La masse corporelle de la femme, particulièrement la matière grasse, a une influence sur sa fonction ovarienne. La menstruation ne débute pas jusqu'à ce que les réserves lipidiques de l'organisme atteignent une certaine proportion de la masse totale corporelle. Même après, l'ovulation et la menstruation régulières peuvent seulement se produire si le contenu approprié de réserves lipidiques de l'organisme est maintenu. Les femmes qui sont de poids insuffisant cessent souvent d'ovuler et d'avoir des règles (Godwin, 2004).

5.5. Exercice physique intense

Les coureuses de longues distances, les gymnastes, les danseuses de ballet et toutes les femmes pratiquant des exercices physiques laborieux intensives tendent à avoir des problèmes dans l'ovulation et la menstruation semblables à ceux décrits ci-dessus (Godwin, 2004).

5.6. Hyperprolactinémie

La cause classique la plus fréquente de dysfonctionnement pituitaire¹ est l'hyperprolactinémie (Keel *et al.*, 2000). Elle se produit dans environ 15% de patientes présentant une aménorrhée (Keel *et al.*, 2000). Il existe plusieurs causes de l'élévation de prolactine : physiologiques, pharmacologiques, et pathologiques (Keel *et al.*, 2000).

La prolactine est produite par les lactotropes dans l'hypophyse antérieure et sa sécrétion est réglée par la dopamine (Keel *et al.*, 2000). La Thyreolibérine, le GnRH, et la bêta-endorphine stimulent la libération de prolactine (Keel *et al.*, 2000).

Les chercheurs spéculent que l'hyperprolactinémie peut empêcher la sécrétion de GnRH et peut affecter la dopamine, qui influence alors sur les pulses de GnRH (Keel *et al.*, 2000).

6. Endométriose

L'endométriose est définie par la présence des glandes et de stroma endométriales en dehors de la cavité endométriale et de la musculature utérine. Le bassin est le site le plus fréquent de l'endométriose, mais les implants endometriotiques peuvent se produire presque n'importe où dans le corps (figure II.4).

Le tissu endometriotique produit des substances toxiques qui peuvent interférer avec l'interaction entre les spermatozoïdes et l'ovocyte dans la trompe utérine causant de ce fait l'infertilité (Godwin, 2004).

¹ La glande pituitaire c'est l'hypophyse.

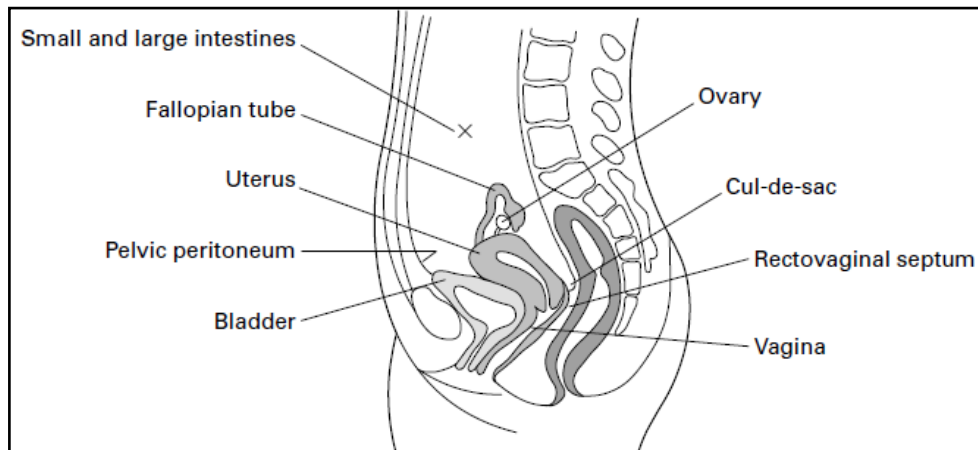


Figure II.4 : Emplacements d'endométriose dans le bassin (Godwin, 2004).

7. Les avortements spontanés à répétition (ASR)

Ils sont définie classiquement en tant que trois avortements spontanés ou plus. Les chercheurs font parfois une distinction entre ASR primaires et secondaires. Les ASR primaires concernent les femmes qui n'ont jamais eu un enfant né vivant, tandis que les femmes avec ASR secondaires ont au moins un enfant né vivant (Keel *et al.*, 2000).

L'étiologie des ASR peut être retrouvée dans approximativement la moitié des cas. Ceux-ci incluent les causes chromosomiques (3.5%), anatomiques (16%), endocriniennes (20%), infectieuses (0.5%), et immunologiques (20%) (Stephenson, 1996).

8. Infertilité non expliquée

Il existe des femmes chez qui aucune cause de stérilité n'est trouvée même après une recherche approfondie. Il s'agit de femmes avec une histoire clinique normale et sans aucune preuve de problème de reproduction.

Les étiologies féminines de l'infertilité sont mieux connues que les étiologies masculines. Pour beaucoup d'entre elles, il existe des traitements adaptés. Pour les problèmes plus nébuleux, et les femmes dont aucune cause n'est trouvée pour l'infertilité, le traitement particulier à donner peut dépendre davantage des facteurs qui se rapportent aux soucis d'âge et à la promptitude du couple pour s'embarquer sur le traitement qui peut être cher, par rapport à la nature du problème d'infertilité (Godwin, 2004).

Chapitre III

Stérilités masculines

L'importance relative du facteur masculin comme cause de l'infertilité des couples est devenue proportionnellement plus grande, en particulier depuis que les biologistes et les gynécologues qui emploient des techniques de l'assistance médicale à la procréation (AMP), détectent de plus en plus de cas de qualité anormale du sperme (Rizk *et al.*, 2008).

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. La terminologie suivante est employée pour décrire les principaux changements :

- Azoospermie : les spermatozoïdes ne peuvent pas être trouvés dans le sperme.
- Aspermie : aucun sperme n'est éjaculé pendant l'orgasme.
- Necrozoospermie : tous les spermatozoïdes dans le sperme sont morts.
- Globozoospermie : aucun des spermatozoïdes n'a le capuchon acrosomial.
- Oligozoospermie : la concentration des spermatozoïdes est moins de 20 million/ml dans l'éjaculat.
- Asthénozoospermie : moins de 50% de spermatozoïdes ont une mobilité progressive.
- Tératozoospermie : la proportion de spermatozoïdes avec une forme normale est moins de 30%.

Un échantillon de sperme peut parfois avoir plus d'un des trois derniers profils anormaux rendant nécessaire une combinaison de terminologie. Ainsi l'oligoasthenotératozoospermie décrit un sperme avec chacune des trois anomalies. De même, la présence de deux anomalies exigera l'utilisation de la terminologie appropriée, par exemple, asthenotératozoospermie (Godwin, 2004).

Plusieurs étiologies de la stérilité masculine ont été répertoriées au fil des années. Mais on ne peut parler de stérilité qu'après s'être assuré que les rapports sexuels entre les deux partenaires sont suffisamment fréquents. En effet quelques couples peuvent se considérer comme infertiles parce qu'ils n'ont pas des rapports assez fréquents pour s'assurer que les spermatozoïdes sont présents dans les voies génitales femelles autour de la période de l'ovulation (Godwin, 2004).

1. Anomalies de l'éjaculation

1.1. 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).

Dans l'échec à l'éjaculation l'homme peut avoir une érection mais ne peut pas éjaculer pendant le rapport sexuel (Godwin, 2004).

1.2. 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).

1.3. Éjaculation rétrograde

Les sphincters de la vessie sont fermés à l'heure de l'éjaculation empêchant de ce fait le sperme de passer 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. Puisque le sperme est propulsé vers l'arrière dans la vessie, plutôt qu'expédié en dehors du pénis, il n'y a aucun dépôt intravaginal de sperme (Godwin, 2004).

1.4. Éjaculation extravaginale

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. Si l'ouverture est située vers le haut sur l'axe (c.-à-d. à la racine du pénis) le sperme sera éjaculé en dehors du vagin (Godwin, 2004).

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 (par exemple une vasectomie), traumatisme, ou 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). Les anticorps anti-spermatozoïdes peuvent mener à l'infertilité, car ils altèrent la mobilité des spermatozoïdes ou réduisent la pénétration de sperme dans le mucus cervical (Nieschlag *et al.*, 2010). La réaction immunitaire produit des espèces réactives oxygénées et l'agglutination de spermatozoïdes aussi bien que la cytotoxicité du sperme dépendante du complément (Rizk *et al.*, 2008).

3. Anomalies isolées du plasma séminal

Chez certains hommes, les spermatozoïdes semblent normaux dans tous les aspects mais ils pourraient adhérer ensemble comme s'il y avait des anticorps anti-spermatozoïdes dans le sperme. Cependant, les tests ne montreront pas les classes connues d'un des anticorps anti-spermatozoïdes. Quelques autres hommes peuvent avoir un bas volume d'éjaculat, un sperme acide ou très alcalin, ou plus de globules blancs que la normale. On dit que tous ces hommes ont des anomalies isolées du plasma séminal (Godwin, 2004).

4. Causes systémiques

Les maladies systémiques telles que le Parkinson, le diabète, les lésions inflammatoires ou tumorales montrent des résultats hautement variables. Dans ces cas le dysfonctionnement érectile est souvent un symptôme du déséquilibre entre les influences excitatives et inhibitrices (Nieschlag *et al.*, 2010).

La tuberculose peut mener au hypogonadisme hypogonadotrope par la perturbation de l'axe gonadique (poste *et al.*, 1994) et peut infiltrer la région uro-génitale, entraînant l'épididymite et par conséquent l'infertilité (Nieschlag *et al.*, 2010).

La fonction testiculaire est diminuée par les caractéristiques communes de maladies systémiques telles que la fièvre (Kandeel and Swerdloff, 1988).

5. Causes toxiques

L'alcool et les stupéfiants compromettent la production des spermatozoïdes, du même pour les toxines qui peuvent être trouvées dans des certains environnements et métiers comme le plomb, le cadmium, le mercure, les pesticides et les herbicides (Godwin, 2004). Le tabagisme réduit la production des spermatozoïdes qui auront aussi un faible pouvoir fécondant (Soares and Melo, 2008). De plus, l'exposition intra-utérine au tabac entraîne une diminution de la numération des spermatozoïdes et une cryptorchidie chez les enfants (Bonde *et al.*, 2010).

6. 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).

Le conduit déférent et/ou les vésicules séminales ne se développent pas dans certains individus particulièrement ceux qui ont ou sont des porteurs de mucoviscidose. De tels individus ont une azoospermie parce que les spermatozoïdes qui sont produits dans les testicules ne peuvent pas être transportés au conduit éjaculatoire et à l'urètre (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 (Foresta *et al.*, 2001). Ces patients présentent une oligozoospermie extrême, une cryptozoospermie quand les spermatozoïdes peuvent seulement être détectés dans le culot après centrifugation, ou une azoospermie.

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

7. Dommages testiculaires acquis

Le virus des oreillons peut également infecter les testicules chez 20-30% des sujets de sexe masculin qui contractent cette infection après la puberté. D'autres infections qui ont été associées à l'infertilité masculine (Rowe *et al.*, 2000) incluent la tuberculose, la bilharzia, la gonorrhée, la chlamydie, la filariose, la typhoïde, la grippe, la brucellose et la syphilis.

Les testicules peuvent être altérés par un traumatisme, une torsion et des accidents chirurgicaux (Nieschlag *et al.*, 2010).

8. Infection de glandes accessoires masculines

Les glandes accessoires (vésicules séminales, prostate et glandes de Cowper) 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. Les infections urinaires peuvent affecter secondairement les glandes accessoires. Ces infections peuvent affecter la contribution de ces glandes au fluide séminal. Elles peuvent également se prolonger au canal déférent et l'épididyme, et causer leur colmatage. (Godwin, 2004).

Les effets des IAGM (Infection de Glandes Accessoires Masculines) sur la capacité de fertilisation de spermatozoïdes sont dus aux nombreux mécanismes, parmi les plus importants on trouve : le volume diminué de l'éjaculat et/ou la viscosité accrue et la composition biochimique anormale du fluide séminal, la mobilité faible des spermatozoïdes, et la faible concentration de sperme (Rizk *et al.*, 2008).

9. Varicocèle

La varicocèle résulte de la pression hydrostatique accrue dans le plexus pampiniforme intra-scrotal 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).

10. Causes endocrines

Le manque de stimulation gonadotrophique des testicules peut être la cause de l'infertilité chez certains hommes. Ceci peut être provoqué par des troubles nombreux qui empêchent la sécrétion de la FSH et de la LH par la glande pituitaire. Parfois le problème peut être plus important, affectant la sécrétion de la gonadolibérine par l'hypothalamus (Godwin, 2004).

Un autre problème endocrine qui peut être associé au facteur d'infertilité masculine est la sécrétion excessive de la prolactine. Parfois il se peut qu'il y ait une tumeur dans la glande pituitaire qui cause la sécrétion non contrôlée de cette hormone (Godwin, 2004).

11. Causes iatrogéniques

La production des spermatozoïdes dans les testicules peut être diminuée par des médicaments utilisés pour le traitement de certains maux. De tels médicaments incluent des hormones, la sulfasalazine, la cimétidine, la nitrofurantoïne, la niridazole, la spironolactone et la colchicine (Rowe *et al.*, 1993, 2000).

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). En outre, les stéroïdes anabolisants employés par quelques athlètes pour améliorer leur performance peuvent avoir des effets secondaires indésirables significatifs sur la fertilité (Godwin, 2004). L'anesthésie générale, une chirurgie importante, les brûlures et le traumatisme crânien peuvent également causer la diminution de la production de spermatozoïdes (Godwin, 2004)

12. Anomalies non expliquées du sperme

Dans environ 25% des partenaires masculins dans les couples stériles 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 comme suit :

- Oligozoospermie idiopathique.
- Asthénozoospermie idiopathique.
- Tératozoospermie idiopathique.
- Cryptozoospermie idiopathique.
- Azoospermie idiopathique (Godwin, 2004).

Il est devenu évident que les facteurs externes jouent un rôle important dans la pathogénie dans cette condition (Rizk *et al.*, 2008). Le style de vie malsain, avec la nutrition non équilibrée, la fumée de tabac, la vie sédentaire, l'obésité, et ainsi de suite ont été incriminés de l'altération de la qualité de sperme (Rizk *et al.*, 2008). L'exposition aux toxines professionnelles et/ou environnementales également joue un rôle pivot (Rizk *et al.*, 2008). Les métaux lourds, la température ambiante élevées, et les polluants chimiques peuvent être présents dans le milieu de travail (Rizk *et al.*, 2008). Cependant, c'est l'exposition aux perturbateurs hormonaux par la nourriture, l'eau potable, et l'air qui est jugé responsable de la détérioration de la qualité du sperme et de l'augmentation simultanée de la prédominance de cancers testiculaires observés dans certaines régions du monde dans les derniers quatre ou cinq décennies (Sharpe and Irvine, 2004).

Des substances synthétiques avec des effets œstrogéniques s'appellent le xéno- ou les pseudo-œstrogènes, incluent des pesticides (DDT), biphényles polychlorés (BPC), furanes et dioxines, phtalates, parabens, ethynloestradiol...etc (Toppari *et al.*, 1996). Ces agents sont hautement résistants à la dégradation, et ils s'accumulent dans l'environnement et dans le corps humains (Rizk *et al.*, 2008). Ils ne se lient pas aux hormones sexuelles dites hormone-binding globulin et ne sont pas métabolisées par le placenta, passant librement dans le système fœtal (Rizk *et al.*, 2008) . Ainsi, les xéno-œstrogènes altèrent le développement testiculaire fœtal causant la persistance des cellules embryonnaires dans l'épithélium germinale qui peut se transformer au cancer du testicule (Skakkebaek *et al.*, 1987, 2001) et gêner la division de cellules de Sertoli et conduire à une maturation avec oligozoospermie plus tard dans la vie (Skakkebaek, 2002). En outre, ces hormones à effet œstrogénique interrupteur d'œstrogènes inhibent l'axe hypothalamo-hypophysaire chez les adultes qui présentent une oligozoospermie avec une FSH non élevé (Rowe *et al.*, 2000). Ces perturbateurs hormonaux, qui se trouvent en particulier dans les pesticides, causent une grave surcharge oxydative, cela endommage la membrane spermatique et l'ADN (Rizk *et al.*, 2008).

Enfin, il faut savoir que l'importance relative des étiologies de l'infertilité masculine varie d'un pays à l'autre et également dans les pays.

On a trouvé que presque la moitié des hommes n'ont aucune cause évidente d'infertilité et leurs paramètres de sperme étaient normaux. Environ un quart de patients a eu des paramètres mauvais de sperme mais aucune cause n'a été trouvée (Godwin, 2004). La base moléculaire de beaucoup de types d'infertilité masculine est mal définie. Un domaine de recherche qui a été étudiée intensément est l'intégrité de l'ADN du noyau des spermatozoïdes matures éjaculés (Sakkas *et al.*, 1999).

Chapitre IV

L'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 and 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).

1. Structure de la chromatine spermatique

La compaction se rapporte à la structure hautement complexe et spécifique dans laquelle l'ADN de spermatozoïdes éjaculés est condensé (Rizk *et al.*, 2008). La chromatine spermatique est une structure hautement organisée, la structure compactée se compose d'ADN et de nucléoprotéines hétérogènes (Evenson *et al.*, 2002).

1.1. Rôle de la condensation de la chromatine spermatique

- Elle Permet le transfert de l'information génétique étroitement compactée à l'œuf (Sakkas *et al.*, 1999).
- Elle Assurer que l'ADN soit livré sous une forme physique et chimique telle que l'embryon en développement peut accéder à l'information génétique (Sakkas *et al.*, 1999).
- Cette condensation nucléaire protège le génome spermatique contre :
 - Les stressés 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).

1.2. Organisation moléculaire de la chromatine spermatique

1.2.1. Compactions de l'ADN spermatique

Dans les derniers stades de la spermatogenèse, le noyau du spermatide est transformé et condensé, un processus qui implique entre autres le déplacement des histones par des protéines de transition et puis par les protamines qui ont la moitié de la taille des molécules d'histones (Steger *et al.*, 2000).

Ward *et al.* (1997) a proposé un modèle pour l'empaquetage de l'ADN spermatique sur la base de son travail et celle d'autres laboratoires (figure IV.1). Ce modèle décrit un assemblage des chromosomes qui sont au début de longs brins d'ADN qui sont graduellement empaquetés à quatre niveaux d'organisation dans le spermatozoïde mature :

- 1) ancrage chromosomique par l'anneau nucléaire ;
- 2) organisation de l'ADN spermatique en un domaine de boucle ;
- 3) condensation par les protamines ;
- 4) organisation du chromosome (Sakkas *et al.*, 1999).

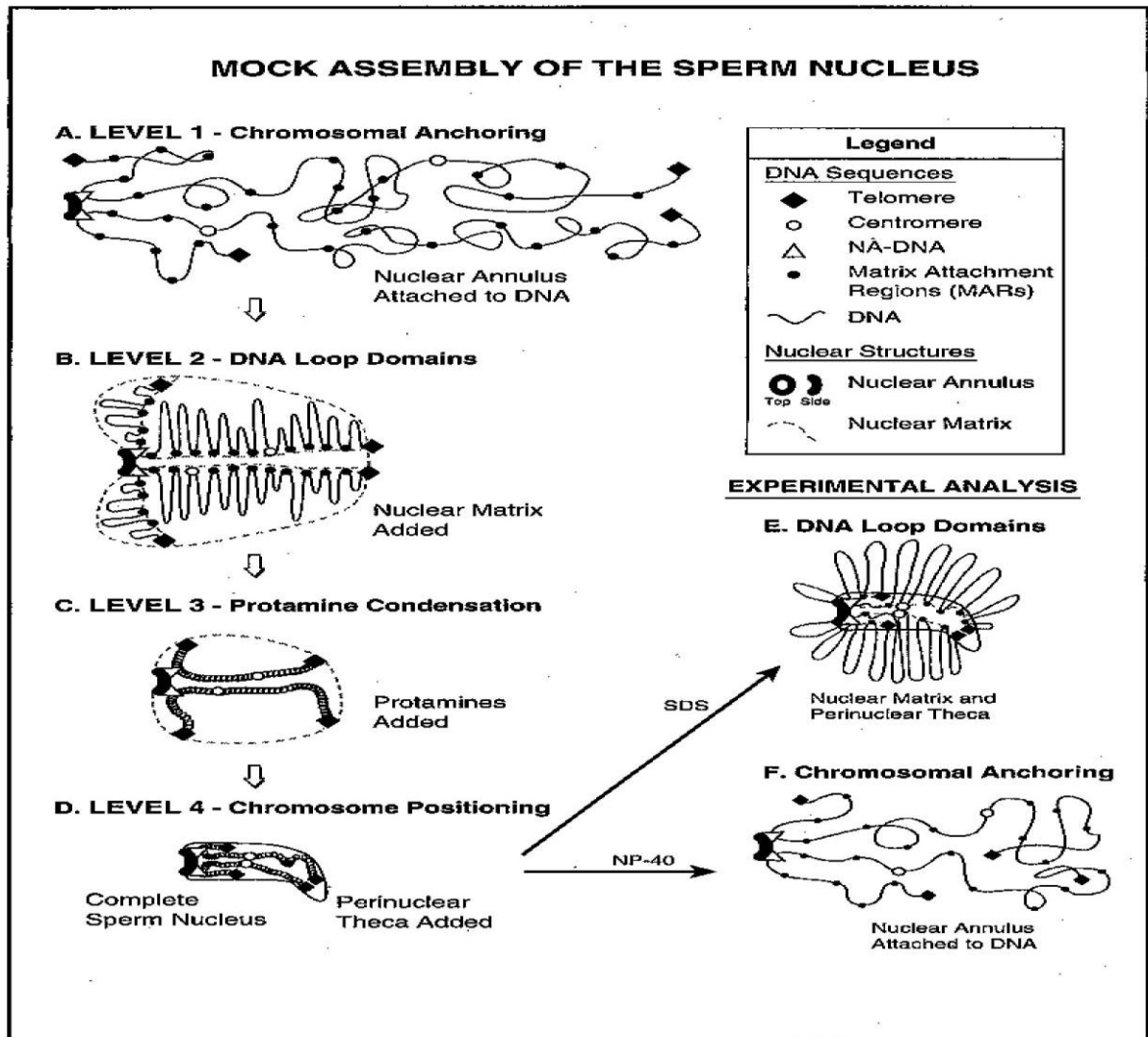


Figure IV.1. Modèle d'organisation de noyau spermatique des mammifères (Ward *et al.*, 1997).

1.2.2. Le modèle de condensation : côte à côte

Balhorn *et al.* (1982) a présenté un modèle de la liaison protamine-ADN. Il a proposé que les protamines se lient à l'ADN se trouvant en longueur à l'intérieur du sillon mineur. Il a observé qu'il y avait assez des groupements d'arginine chargés positivement sur les protamines présentes dans le noyau spermatique de souris pour neutraliser complètement les groupements phosphate d'ADN chargés négativement. En conclusion, il a proposé que le complexe protamine-ADN d'un brin s'insère dans le sillon majeur d'un brin d'ADN voisin, de sorte que les brins d'ADN du noyau spermatique soient compactés côte à côte dans une rangé linéaire.

Les brins d'ADN sont étroitement enroulés autour des molécules de protamines (environ 50 kb d'ADN par protamine), formant des boucles étroitement et fortement organisées (toroïdes) (Brewer *et al.*, 1999) (figure IV.2). Les ponts disulfures inter et intramoléculaires entre les protamines riches en cystéines sont responsables de la compaction et de la stabilisation du noyau spermatique (Rizk *et al.*, 2008).

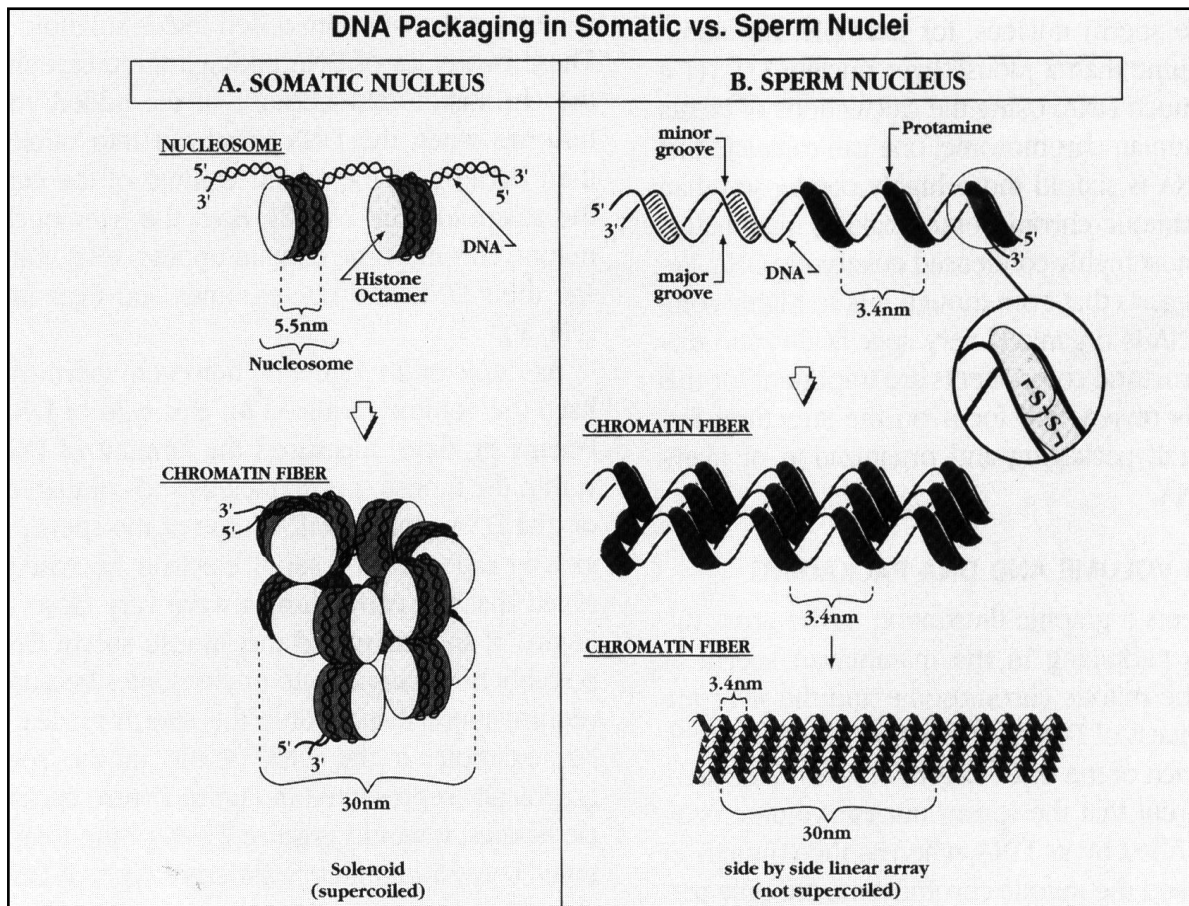


Figure IV.2. Protamination de l'ADN spermatique selon le model de cote à cote (Ward and Coffey, 1991).

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 ; Gineitis *et al.*, 2000).

Des preuves récentes suggèrent que l'ADN attaché aux histones dans les spermatozoïdes correspond à des familles de gènes qui sont importantes pour la différenciation cellulaire et la structuration précoce d'embryon (Hammoud *et al.*, 2009).

Contrairement aux mammifères dont les spermatozoïdes contiennent seulement un type de protamine (P1), les spermatozoïdes humains contiennent un deuxième type de protamine (P2), qui est déficiente en résidus de cystéine (Corzett *et al.*, 2002).

2. Fragmentation de l'ADN spermatique

2.1. Fragmentation d'ADN pendant la spermiogenèse

Les brèches endogènes de l'ADN sont présentes normalement dans des étapes spécifiques de la spermiogenèse 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 importantes pendant la transition de spermatides rond 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 and Longo, 1992, 1993a,b ; Sakkas *et al.*, 1995).

McPherson and 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 spermiogenèse. 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 produise chez l'homme (Marcon and 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 and Longo, 1993b ; Laberge and Boissonneault, 2005).

2.2. Induction d'apoptose pendant la spermatogenèse

La deuxième théorie propose que la présence des brèches endogènes dans les spermatozoïdes humains éjaculés est 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).

Un facteur est supposé être impliqué dans l'apoptose des spermatozoïdes est la protéine de surface cellulaire, Fas (figure V.3) (Lee *et al.*, 1997). Fas est une protéine membranaire de type I qui appartient à la famille de *tumour necrosis factor*, et elle est impliquée dans l'apoptose (Suda *et al.*, 1993 ; Krammer *et al.*, 1994 ; Schulze-Osthoff *et al.*, 1994).

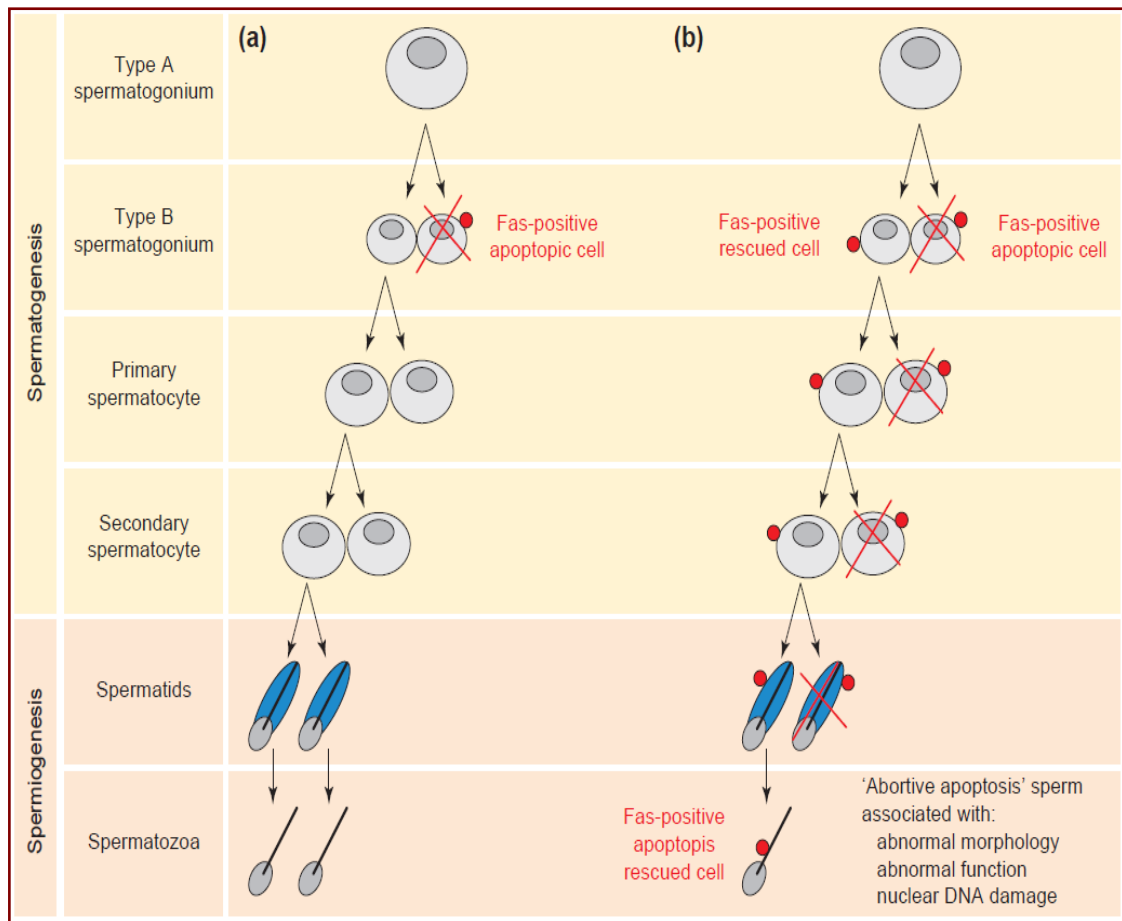


Figure IV.3. Le rôle de Fas pendant la spermatogénèse dans les hommes avec les paramètres spermatiques (a) normaux et (b) anormaux (oligospermiques, asthénospermiques et tératospermique) (Sakkas *et al.*, 1999).

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 dans les souris et les rats qu'en état normal, les cellules de Sertoli expriment les FasL et signalent la destruction des cellules germinales Fas-positive, limitant la taille de la population de cellule germinale aux nombres qu'elles peuvent soutenir (Lee *et al.*, 1997 ; Rodriguez *et al.*, 1997).

Le rôle de Fas pendant la spermatogenèse chez l'homme est peu clair. Toutefois, il y a un certain nombre d'indications que l'apoptose se produit pendant la spermatogenèse chez l'homme. 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 spermiogenèse et n'accompliront pas l'apoptose (Sakkas *et al.*, 1999).

2.3. Fragmentation de l'ADN spermatique poste-testiculaire

Une caractéristique importante qui est 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'ADN 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 and Alvarez, 2010).

2.4. Stresse oxydatif

Les espèces réactives oxygénées (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) jouent un rôle physiologique important en modulant les activités des gènes et des protéines essentiels pour la prolifération, la différenciation et la fonction de 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).

Les études récentes montrent que les spermatozoïdes non matures, qui produisent 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 and 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 cytoplasmique²) 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, une technique toujours employée dans quelques cliniques pour préparer des spermatozoïdes pour la PMA (Aitken and 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 superoxyde dismutase, la catalase, et la peroxydase de glutathion/réductase (Griveau and Le Lannou, 1997).

2.5. 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).

2.6. 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).

2.6.1. 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).

2.6.2. 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).

² Le cytoplasme résiduel se forme lors de l'élongation de spermatide pendant la spermiogenèse et qui s'écoule vers l'arrière puis phagocyté par les cellules de Sertoli.

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-ethylhexyl) phtalate ont été associés à un pourcentage élevé d'ADN avec la queue de comète en utilisant le test neutre de COMETE (voir ci-dessous) (Hauser *et al.*, 2007).

2.6.3. 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 (Sperm Chromatin 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).

2.6.4. 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 à la Chine (Xu *et al.*, 2003).

2.6.5. 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.

3. Les tests de fragmentation d'ADN

Pendant les dernières deux décennies un certain nombre de tests ont été introduits pour l'analyse de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. 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 le SCSA (Evenson *et al.*, 1980a, b ; Larson *et al.*, 2000 ; Evenson *et al.*, 2002).

³ 8-oxo-2'-désoxyguanosine (8OHdG) est un dérivé oxydé de la désoxyguanosine. 8OHdG est l'un des principaux produits d'oxydation de l'ADN. Les concentrations de 8OHdG au sein d'une cellule sont une mesure du stress oxydatif.

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.-à-d, 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 and Alvarez, 2010).

On distinguera les tests de type cytochimique de caractérisation de la chromatine (utilisant des colorants ou des fluorochromes) et les tests biochimiques visant à fragiliser l'architecture chromatinienne, préalablement à la mise en œuvre de techniques microscopiques ou de biochimie analytique (Roux *et al.*, 2004).

3.1. Les techniques de mesure de la fragmentation d'ADN spermatique

3.1.1. 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), l'émission de la fluorescence se produit à 530 nm (vert) ; lorsqu'elle se lie à de l'ADN monocaténaire (simple-brin), l'émission de la fluorescence se dévoile à 600 nm (rouge). Le degré de dénaturation de l'ADN in situ (ou paramètre α_t) peut être déterminé en mesurant le rapport de la fluorescence rouge au total de la fluorescence nucléaire (rouge + vert) (Sergrie *et al.*, 2005). Evenson *et al.* (2002) ont modifié l'appellation du paramètre α_t pour celui de l'index de fragmentation d'ADN (IFA).

3.1.2. 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 CMA3. Comme pour le test de coloration à l'AO celui à la CMA3 nécessite un microscope à fluorescence (Roux *et al.*, 2004).

3.1.3. 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. Le signal peut-être amplifié par l'utilisation d'un fluorochrome conjugué à de l'avidine et facilement identifiable en microscopie à fluorescence (Sergrie *et al.*, 2005).

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).

3.1.4. 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 (figure IV.4). 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).

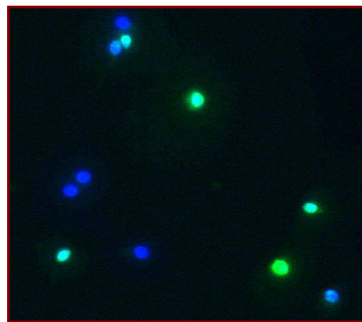


Figure IV.4. Test TUNEL. En couleur bleue : les spermatozoïdes normaux (TUNEL négatif). En couleur verte : les spermatozoïdes avec fragmentation d'ADN (TUNEL positif) (Hazout *et al.*, 2008).

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. L'utilisation de la microscopie à fluorescence peut être une alternative à la cytométrie en flux notamment en cas d'oligozoospermie très sévère (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).

Cette technique de marquage élimine les problèmes liés à la fluorescence se fanant dans la méthode microscopique, donnant de ce fait aux techniciens plus de temps d'analyser un plus grand nombre de cellules (300 cellules ; Host *et al.*, 1999a, b ; 2000a, b).

3.1.5. 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 IV.5 (d'où l'appellation COMET assay) (Sergrie *et al.*, 2005).

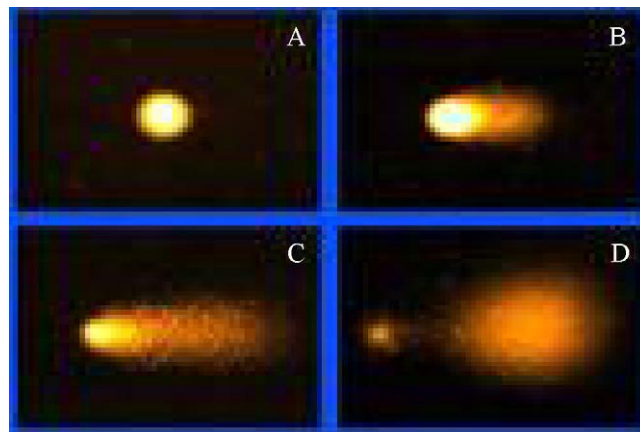


Figure IV.5. Test Comète. A et B : sperme normal ; C et D: sperme fragmenté (image en « poussière d'étoile ») (Hazout *et al.*, 2008).

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 (Sergrie *et al.*, 2005).

L'analyse alcaline de COMÈTE (pH >10) dénature l'ADN spermatique et identifie donc les cassures simple et double brins d'ADN (Evenson *et al.*, 2002).

3.1.6. 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 déprotéïnisés s'appellent « les nucleoïdes ». 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 Roti and Wright, 1987 ; Smith and 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 de ADNsb (Gorzcyca *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 intact, 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).

3.2. Avantages et inconvénients de chaque technique

Chaque analyse a des avantages et des inconvénients qui affectent sa disponibilité et son utilité (tableau IV.1).

Il y a des différences claires dans les protocoles évaluant l'intégrité d'ADN. En raison du manque de normalisation des méthodes, il est difficile de déterminer si les variations des résultats sont vraies (lié à la biologie) ou dues aux différences dans la méthode (Barratt *et al.*, 2010).

Actuellement, aucun des protocoles ne semble aborder le problème de différents types de stabilisation de chromatine. Des méthodes normalisées qui permettent la comparaison des résultats de différents laboratoires sont instamment exigées. Pour une interprétation correcte des données, il est également essentiel de comprendre et contrôler les changements de la chromatine spermatique qui se déroulent après l'éjaculation et distinguer les dommages véritables d'ADN et les artefacts dus au manque d'accès de réactif à l'ADN (Barratt *et al.*, 2010).

Tableau IV.1. Avantages et inconvénients de diverses analyses d'intégrité d'ADN (Zini *et al.*, 2009)

Technique	Avantages	Inconvénients
<i>Analyse directe</i>		
Terminal Uridine Nick-End labeling TUNEL	<ul style="list-style-type: none"> - Peut être exécuté sur une petite quantité de spermatozoïdes. - Équipement cher non requis. 	<ul style="list-style-type: none"> - Seuil non normalisé. - Protocoles d'analyse variables.
Single Cell Gel Electrophoresis Assay COMET	<ul style="list-style-type: none"> - Sensible. - Exécutable sur une petite quantité de spermatozoïdes. - Alcaline : identifie toutes les cassures. - Neutre : peut identifier les cassures les plus pertinentes cliniquement. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessite une main-d'œuvre. - Nécessite un logiciel d'imagerie. - Protocoles d'analyse variables. - Alcaline : peut identifier des fragmentations cliniquement sans importance. - Peut induire des cassures dans des sites de marquage alcalin. - Neutre : moins sensible.
In situ nick translation NT	<ul style="list-style-type: none"> - Simple. 	<ul style="list-style-type: none"> - Seuils peu clairs. - Moins sensible.
<i>Analyses indirectes</i>		
Sperm chromatin dispersion SCD	Facile, peut employer la microscopie photonique.	<ul style="list-style-type: none"> - Données cliniques limitées.
Sperm Chromatin Structure Assay – SCSA	<ul style="list-style-type: none"> - Nombreuses cellules examinées rapidement. - La plupart des données publiées. 	<ul style="list-style-type: none"> - Des petites variations dans les conditions de laboratoire influent sur les résultats. - Les calculs impliquent des décisions qualitatives.
Test à l'acridine orange manuel OA	Simple.	<ul style="list-style-type: none"> - Difficulté avec des couleurs indistinctes, décoloration rapide, coloration hétérogène.

Cependant, le test de décondensation de la chromatine spermatique (SCD), du fait de sa simplicité, sa rapidité et surtout l'unicité de son protocole et sa concordance avec le taux de fragmentation d'ADN détecté par d'autres techniques comme les test TUNNEL et SCSA (Chohan *et al.*, 2006) (Figure IV.6) constitue, à notre avis, le test le plus adéquat pour la réalisation de notre étude, d'où notre choix de l'utiliser.

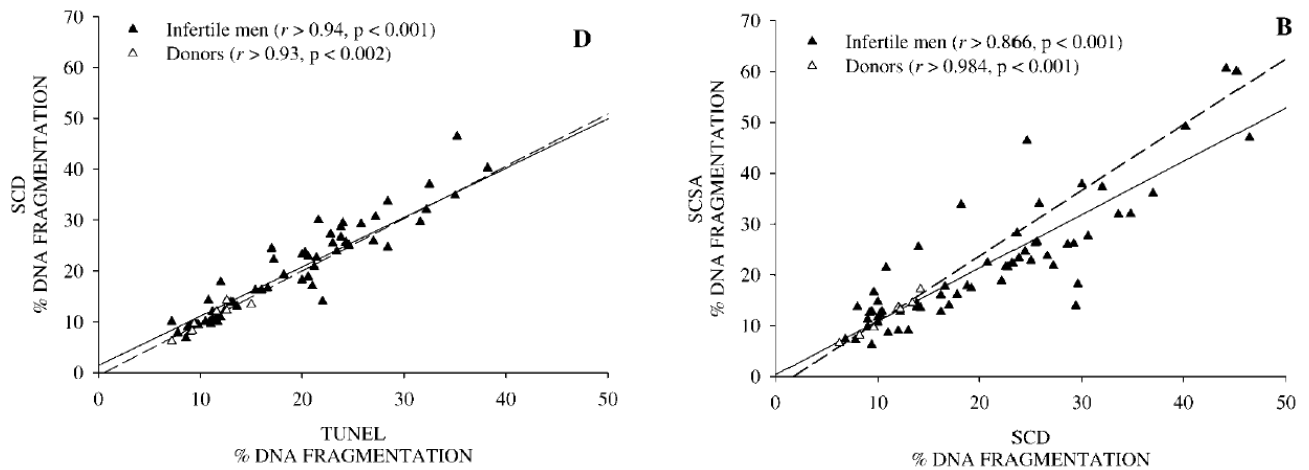


Figure IV.6. Comparaison des taux de fragmentation de l'ADN spermatique par la technique SCD et la technique TUNEL ou SCSA (Chohan *et al.*, 2006).

Chapitre V

Injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI)

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

- **L'insémination artificielle avec le sperme:** le sperme de l'homme, 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* (FIV):** le sperme et les ovocytes sont en mis 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):** c'est une technique récente de laboratoire qui s'ajoute à une FIV classique.

Le premier rapport d'une grossesse avec ICSI (Palermo *et al.*, 1992) bientôt a été suivi de l'application de cette technique de reproduction assistée dans le monde entier en routine (Nieschlag *et al.*, 2010), et a révolutionné la gestion de l'infertilité masculine (Godwin, 2004).

1. Définition de l'ICSI

La fécondation *in vitro* avec microinjection ou ICSI n'utilise qu'un seul spermatozoïde qui est introduit dans le cytoplasme ovulaire à l'aide d'une micropipette (Zoran and Saval, 1999).

2. Indications de l'ICSI

2.1. Indications absolues

L'indication essentielle de l'ICSI (tableau V.1) est la stérilité masculine (Zoran and Saval, 1999).

Du côté féminin, les indications de l'ICSI sont rares, repérées à la suite d'échec de FIV classique et difficile à authentifier : anomalie de la zone pellucide (pellucide épaisse et de structure anormale) empêchant la pénétration des spermatozoïdes, perturbation des capacités fusiogènes de la membrane plasmique, anomalie de la réaction corticale entraînant une absence de blocage de la polyspermie (Zoran and Saval, 1999).

2.2. Indications relatives

L'indication principale est l'échec de FIV classique pour stérilité masculine ou stérilité idiopathique (Zoran and Saval, 1999).

L'ICSI peut être également préférable lorsque sont associés des facteurs féminins et masculins : médiocre réponse à la stimulation ovarienne ne permettant le recueil que d'une faible

cohorte ovocytaire (< 5 ovocytes mûrs) et altérations spermatiques diminuant les chances de fécondation (Zoran and Saval, 1999).

Tableau V.1. Indications pour l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (Godwin, 2004).

Echec précédent de fécondation

Diminution marquée des paramètres de sperme:

Numération de sperme < 5 million/ml

Mobilité progressive < 10%

Morphologie normale < 4%

Nombre total de spermatozoïdes mobiles après préparation de sperme < 1 million

Groupes de patients spécifiques :

Éjaculation rétrograde

Impuissance nécessitant une électro-éjaculation

Problème séminal grave d'anticorps anti-spermatozoïdes

Sperme congelé de mauvaise qualité (par exemple celui des malades atteints de cancer du testicule)

Le sperme des patients présentant un diagnostic initial de l'azoospermie

Ovocytes maturés in vitro

3. Technique de l'ICSI

3.1. Le recueil de sperme de patients

Habituellement, le sperme peut être recueilli pour la procréation assistée par masturbation après une période d'abstinence de 2-7 jours, comme recommandé par l'OMS (WHO, 1999). Le délai de l'abstinence doit être noté, car l'absence de rapport entraîne une augmentation du volume de l'éjaculat et du nombre de spermatozoïdes éjaculés. Cette relation est linéaire s'il est compris entre deux et cinq jours. Une abstinence longue diminue la mobilité (Zoran and Saval, 1999).

3.1.1. La masturbation

Le pénis répond à la chaleur, à la pression, et au frottement. De toutes les méthodes possibles de fourniture de sperme, la masturbation est la méthode de recueil la plus pratique et la plus recommandée. Éjaculer dans un récipient stérile propre, fourni par le laboratoire. Le récipient

idéal de collection de sperme devrait être un récipient en plastique non toxique jetable avec un couvercle à visser (Jeyendran, 2003).

3.1.2. Autre méthodes de recueil de sperme

Dans les patients souffrant de l'impuissance, l'éjaculation peut également être induite par vibration ou par électro-éjaculation. Bien que ces procédures soient efficaces dans 90% des patients, les spermatozoïdes viables de quelques patients peuvent être également recueillis par l'aspiration de l'épididyme (MESA) ou par une biopsie testiculaire (TESE) (Nieschlag *et al.*, 2010).

Dans les patients souffrant de l'éjaculation rétrograde, trois méthodes différentes peuvent être employées pour le recueil de sperme dans la procréation assistée.

- D'abord, l'éjaculation antégrade peut être réalisée par l'administration de médicaments spécifiques, telles que les substances alpha-adrénergiques.
- Une méthode alternative à recueillir le sperme éjaculé frais de la vessie par un cathéter.
- Une troisième méthode comprend l'extraction des spermatozoïdes du tissu testiculaire (TESE) (Nieschlag *et al.*, 2010).

3.2. Préparation de sperme pour l'ICSI

Aujourd'hui les procédures et les techniques de préparation de sperme ont évolué bien au delà du déplacement du plasma séminal : les spermatozoïdes non mobiles et les débris cellulaires qui peuvent interférer le potentiel de fécondation des spermatozoïdes normaux peuvent également être débarrassés. Ces procédures aident à améliorer la qualité et la quantité globale de sperme.

Avant que le vrai traitement de l'échantillon de sperme puisse être commencé, le sperme doit être liquéfié par incubation simple à la température ambiante pendant 30 mn (Jeyendran, 2003).

3.2.1. Lavage du sperme

Le lavage de sperme, utilisant la dilution et puis la centrifugation, est la procédure primaire pour séparer le sperme du plasma séminal.

Un procédé de lavage du sperme est exigé, parce que le plasma séminal - même à une basse concentration (10%) - peut exercer des effets toxiques sur les spermatozoïdes lui-même. En outre, les bactéries peuvent être présentes dans le sperme (Nieschlag *et al.*, 2010).

3.2.2. Les différentes méthodes de préparation du sperme

A. La filtration

La filtration des spermatozoïdes sur une colonne préchargée avec la laine de verre (Paulson and Polakoski, 1977) ou avec les perles en verre (Daya *et al.*, 1987) a trouvé une certaine acceptation. La suspension contenant les spermatozoïdes séparés du plasma séminal est chargée sur une colonne positionnée verticalement, qui est prérempli avec 15 mg de laines de verre ou

avec 1 g de perles en verre (chacun du diamètre de 75 à 150 micromètres). Avant d'ajouter la suspension de sperme la colonne est rincée par un milieu de culture pour éliminer les substances toxiques potentielles et pour équilibrer le contenu de la colonne. La suspension de sperme est alors ajoutée en dessus de la colonne, qui coule en bas, et une fraction hautement mobile des spermatozoïdes peut être recueillie goutte-à-goutte de la colonne et peut être employée pour la procréation assistée. Les spermatozoïdes immobiles, les leucocytes et les cellules rondes tendent à adhérer au verre ou à rester coincés dans les mailles, contrairement aux spermatozoïdes mobiles, qui traversent aisément la colonne (Nieschlag *et al.*, 2010).

La filtration du sperme a l'avantage de réaliser rapidement un rendement élevé de spermatozoïdes progressivement mobiles. À cet égard la filtration du sperme avec des colonnes chargées avec les laines de verre semble être aussi efficace que la méthode de migration ascendante ou *swim-up* (Van Der Ven *et al.*, 1988 ; Katayama *et al.*, 1989) ou que la centrifugation de gradient de densité (Van Den Bergh *et al.*, 1997). La perte de spermatozoïdes pendant le procédé de filtration semble être réduite et la durée du traitement est particulièrement courte (10 minutes) (Nieschlag *et al.*, 2010).

B. La migration ascendante (*Le swim-up*)

Le *swim-up* est une méthode décrite à l'origine par Lopata *et al.* (1976). Dans le sperme issu par le procédé de *swim-up*, la capacité naturelle des spermatozoïdes mobiles de migrer contre la gravité est employée pour choisir une population mobile de spermatozoïdes (Jeyendran, 2003).

La signification de *swim-up* pour la préparation de sperme est ces propriétés requises pour la pénétration des spermatozoïdes mobiles dans le surnageant sont les même pour la pénétration dans le mucus cervical et pour la fécondation réelle des ovocytes (De Geyter *et al.*, 1988).

Des milieux à faible viscosité sont posés au-dessus du sperme (sans centrifugation initiale), ou au-dessus d'un granule de sperme (obtenu par centrifugation) : les spermatozoïdes migrent alors naturellement vers le haut contre la gravité, laissant tous autres facteurs non dynamiques dans l'échantillon (Jeyendran, 2003).

Par rapport à d'autres méthodes de préparation de sperme telles que la centrifugation de gradient de densité et la filtration, le *swim-up* est caractérisé par une meilleure mobilité et des nombres relativement plus élevés de spermatozoïdes normaux (Englert *et al.*, 1992).

La méthode de *swim-up* est hautement reproductible lorsqu'elle est effectuée par différents techniciens (Nieschlag *et al.*, 2010).

C. La migration descendante (*Le swim-down*)

Dans le procédé de *swim-down*, la capacité naturelle des spermatozoïdes mobiles de migrer à l'aide de la gravité est employée pour choisir une population mobile de spermatozoïdes.

Ce concept est mis en application en posant le sperme ou le sperme lavé au-dessus des milieux plus lourds et plus visqueux. Les spermatozoïdes migrent alors dans et vers la force de la gravité, « le *swim-down*, » séparant de ce fait les spermatozoïdes mobiles de l'échantillon restant au-dessus (Jeyendran, 2003).

D. La centrifugation en gradient de densité

La méthode de centrifugation en gradient de densité est un procédé utilisant un gradient de densité continu ou discontinu, en même temps que la centrifugation. Un tel procédé sépare sélectivement les spermatozoïdes selon leur taille, leur mobilité, et leur densité différentielle (Nieschlag *et al.*, 2010). Pour que la méthode de centrifugation en gradient de densité soit efficace, le gradient de densité ne devrait pas ou devrait avoir l'effet osmotique minimal une fois ajouté au milieu. Le gradient devrait également avoir une viscosité très basse, ayant de ce fait un effet minimal sur le taux de sédimentation de spermatozoïdes (Jeyendran, 2003). Le gradient devrait également avoir une gravité spécifique élevée pour faciliter la sédimentation des spermatozoïdes, et soit inerte pour ne pas interférer avec la qualité de spermatozoïdes. Deux substances satisfont les exigences indiquées ci-dessus à un gradient de densité réussi : elles sont la silice colloïdale et un dérivé triodinate d'acide benzoïque (avec trois chaînes latérales hautement hydrophiles aliphatiques - autrement connu comme iodixanol) (Jeyendran, 2003).

L'éjaculat est placé en haut de la colonne, après centrifugation, les spermatozoïdes mobiles se retrouvent dans la phase la plus concentrée, en bas de la colonne, tandis que les autres éléments figurés et le plasma séminal restent dans les autres phases. Cette méthode donne des meilleurs résultats avec les spermés anormaux. Elle élimine mieux les leucocytes, les spermatozoïdes morts, les débris cellulaires (Zoran and Saval, 1999).

Comparé à la méthode de *swim-up* (au moins 60 minutes), la préparation de sperme avec la centrifugation de gradient de densité (20 minutes) est moins longue (Nieschlag *et al.*, 2010).

3.3. Maturation folliculaire

3.3.1. ICSI en cycle spontané

Bien que théoriquement possible, l'ICSI n'est jamais conduite en cycle spontané, car les aléas de la technique imposent de pouvoir disposer de plusieurs ovocytes pour avoir des chances raisonnables de succès (Zoran and Saval, 1999).

3.3.2. ICSI en cycle stimulé

Le pic naturel de LH qui se produit pendant environ 36-40 heures avant l'ovulation, est indésirable pendant le traitement par ICSI pour trois raisons :

1) il peut se produire prématurément avant qu'un nombre d'ovocytes adéquat n'atteignent le stade de développement requis ;

2) le rendement endogène de LH peut ne pas être adéquat pour l'induction des changements de maturation finale de tous les ovocytes en développement ;

3) puisque les ovocytes doivent être aspirés des ovaires avant que l'ovulation ne se produise, il est important que ces événements soient programmés tels que l'ovulation ne se produit pas avant que le personnel médical soit prêt pour le procédé d'aspiration d'ovocytes (Godwin, 2004).

A. Les agonistes de Gonadotrophine releasing hormone (GnRHa)

Ces médicaments sont employés pour empêcher la glande pituitaire d'interférer la fonction des ovaires pendant la stimulation ovarienne. Pendant le traitement par l'ICSI, les ovaires sont stimulés avec les doses relativement grandes d'hormone de stimulation folliculaire (FSH) et de l'hormone luteinisante (LH) qui sont administrés comme injections quotidiennes. Ceci vise la production de plusieurs ovocytes (de 5-20). Cette approche à la stimulation ovarienne s'appelle « la superovulation ». Les GnRHa sont des analogues de gonadotrophine releasing hormone (GnRH) mais sont plusieurs fois plus puissantes (Godwin, 2004). La gonadotrophine releasing hormone est une hormone peptidique de 10 acides aminés (Keel *et al.*,2000). Leur administration cause une forte production de FSH et de LH pituitaire mais elle est relativement éphémère. L'administration prolongée de GnRHa épuise les stocks pituitaires de ces hormones et leur rendement tombe aux niveaux très bas. Ceci s'appelle le blocage pituitaire et le manque de réponse de la glande pituitaire à d'autres doses de GnRHa serait dû à la désensibilisation pituitaire. Ces événements sont habituellement accomplis de 10-14 jours dès le début d'administration chronique de GnRHa (Godwin, 2004).

Les différentes méthodes établies d'administration de GnRHa sont nommées « les protocoles ».

L'administration de GnRHa dans le « protocole long » est débutée au milieu de la phase lutéale (jour 21) du cycle menstruel précédant le cycle de traitement ou à partir de la phase folliculaire précoce (jour 2) du cycle de traitement lui-même (Godwin, 2004). Les longs protocoles sont employés quand la phase d'inhibition est désirée avant la stimulation ovarienne (Keel *et al.*,2000). Le GnRHa est administré pendant 10-14 jours avant de commencer l'injection des gonadotrophines et continuée jusqu'à l'administration du déclencheur de l'ovulation (Godwin, 2004).

Des « protocoles courts » sont typiquement employés pour tirer profit de l'effet de pic (Keel *et al.*, 2000). Le protocole court comporte l'utilisation de GnRHa dans les jours 1, 2, ou 3 du cycle de traitement jusqu'au jour de l'administration du déclencheur de l'ovulation. Des injections de gonadotrophine sont commencées un ou deux jours après avoir commencé l'administration de

GnRHa. La suppression de l'activité pituitaire sera exigée généralement pendant environ quatre semaines (28 jours) (Godwin, 2004).

B. Injections de gonadotrophines

Des injections de gonadotrophines sont continuées jusqu'à ce que plusieurs follicules en développement atteignent le diamètre de 18-22 millimètres. Les injections sont habituellement données pendant un total de 12-16 jours mais l'administration peut être prolongée à 21 jours pour de mauvaises répondeuses ou quand il y a une approche très prudente à la superovulation, par exemple, dans celles qui ont eu un syndrome précédent d'hyperstimulation ovarienne (OHSS pour *Ovarian Hyper Stimulation Syndrome*) ou celles connues pour avoir des ovaires polykystiques (Godwin, 2004).

3.4. Déclenchements d'ovulation

3.4.1. Injection de l'hormone gonadotrophique chorionique

Puisque le pic naturel de LH est supprimé en employant GnRHa, des déclenchements alternatifs d'ovulation sont exigés. La gonadotrophine chorionique humaine (hCG) est une hormone glycoprotéique qui partage les homologies de structure principales avec la LH et peut induire la maturation similaire d'ovocyte dans les follicules en développement. Une injection de médicament est administrée quand les follicules en développement atteignent la taille adéquate. Les ovocytes sont aspirés des ovaires environ 34-36 heures après l'injection d'hCG. L'administration de GnRHa est arrêtée une fois que le hCG est injectée (Godwin, 2004).

3.4.2. Balayage par l'échographie

Le balayage par l'échographie est la méthode principale de surveiller la réponse de la femme à la stimulation ovarienne.

Une première échographie est effectuée 10-14 jours après début du traitement de GnRHa. La prochaine échographie sera programmée pour avoir lieu après six à huit jours d'injections de gonadotrophine. Plus tard, des échographies sont effectuées quotidiennement, chaque jour ou à plus longs intervalles selon la réponse observée de la patiente. Le nombre de follicules en développement dans chaque ovaire est vérifié et leur taille est mesurée (Godwin, 2004).

3.4.3. Analyses hormonales

La concentration de l'œstrogène, de la progestérone, de FSH et de la LH peut être mesurée par les prises de sang qui sont effectuées 10-14 jours après début du traitement par GnRHa. Ceci permet de s'assurer qu'un contrôle adéquat a été réalisé par la fonction pituitaire. L'analyse suivante mesure principalement l'œstrogène qui est produit par les follicules en développement dans les ovaires. La concentration de cette hormone dans le sang peut donner une indication à

quel point les ovaires répondent à la stimulation et si la femme est au-dessus de la réponse aux injections de gonadotrophine (Godwin, 2004).

3.5. Ponction d'ovocytes

La patiente se présente à l'unité de procréation assistée le matin du procédé. Elle devrait être à jeun depuis au moins cinq heures. De diverses formes d'anesthésies peuvent être employées mais les sédatifs et les narcotiques intraveineux de courte durée sont les plus communs (Godwin, 2004). Une échographie transvaginale est effectuée et les ovocytes sont aspirés à partir des follicules dans les deux ovaires par une aiguille qui est employée pour percer la face extérieure vaginale et pour piquer le follicule.

Chaque tube de fluide aspiré est examiné pour identifier l'ovocyte qui est alors enlevé et lavé dans un milieu de culture propre et mis dans un incubateur (Godwin, 2004).

Eclosion assistée (*hatching*)

Le *hatching* consiste à fragiliser la zone pellucide soit chimiquement à l'aide de Tyrode acide, soit mécaniquement, en l'éclosion du blastocyste (Zoran and Saval, 1999).

3.6. ICSI

Au cœur de l'équipement installé on trouve un microscope à contraste de phase inversé (figure V.1). L'équipement de Micromanipulation est monté sur le microscope pour l'usage pendant le procédé d'ICSI (figure V.2) (Godwin, 2004). La micropipette, chargée d'un seul spermatozoïde, est introduite dans le cytoplasme ovulaire, qui est aspiré en partie pour vérifier la pénétration, puis refoulé à sa place en même temps que le spermatozoïde (figure V.3). La préparation est remise à l'étuve. Le lendemain matin, au bout de 17 heures environ, un nouvel examen permet de repérer les deux pronucléus. Le surlendemain, les embryons, au stade de deux à quatre cellules, sont classés (Zoran and Saval, 1999).

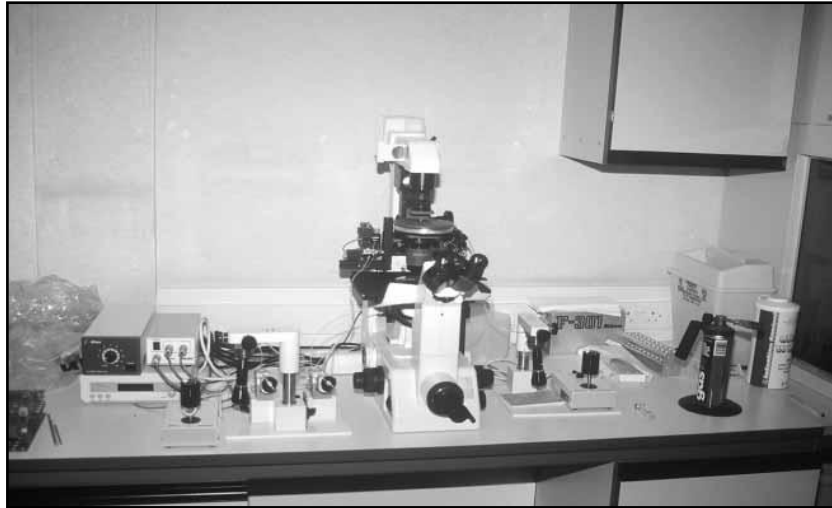


Figure V.1. Microscope de Nikon Diaphot avec l'équipement de micromanipulation et les microinjecteurs (Godwin, 2004).



Figure V.2. Vue supérieure proche d'une partie de microscope montrant la plaque métallique électriquement chauffée sur laquelle la boîte contenant les gamètes est placée (Godwin, 2004).

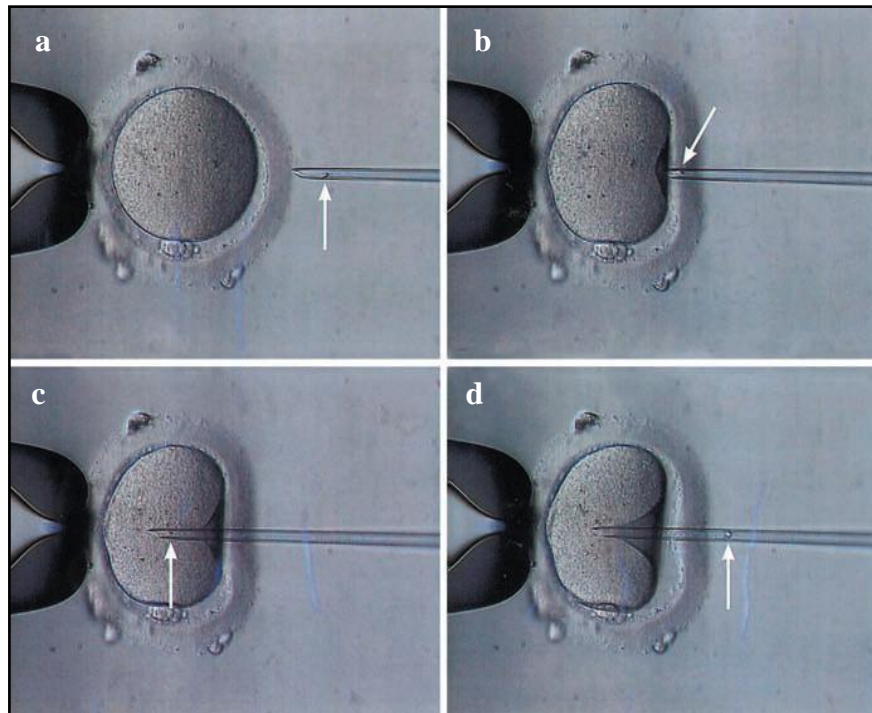


Figure V.3. Injection d'un seul spermatozoïde mobile dans le cytoplasme ovocytaire (ICSI).

a: Le spermatozoïde est capturé par la micropipette d'injection, qui est alors dirigée vers l'oocyte fixé par une pipette de maintien. b: La pénétration de zone pellucide c: La pénétration de membrane vitelline de l'ovocyte. d: L'aspiration de cytoplasme dans la pipette d'injection avant que le spermatozoïde est transmise dans l'oocyte (Nieschlag *et al.*,2010).

3.7. Transfert d'embryons

3.7.1. Le nombre d'embryons à transférer

La possibilité envers ça grossesse se produisant chez n'importe quelle patiente dépend en partie du nombre d'embryons transférés. Plus le nombre d'embryons qui sont transférés est grand plus les possibilités de la procréation sont grandes, au moins jusqu'à un certain point (Godwin, 2004).

Cependant, l'incidence de la grossesse multiple augmente également avec le nombre d'embryons qui sont transférés (Devreker *et al.*,1999 ; Matson *et al.*,1999). Un compromis que beaucoup de cliniciens adoptent généralement est de transférer trois embryons. Les jeunes patientes (moins de 20 ans) peuvent être conseillées, sans les contraindre, de ne placer que deux embryons. Il est également recommandé pour des femmes âgées de moins de 35 ans de placer seulement deux embryons la première fois qu'elles subissent le traitement par l'ICSI, si tous autres aspects de leur traitement sont normaux. Trois embryons peuvent être transférés chez les femmes entre 36 et 40 ans tandis que quatre embryons peuvent être transférés chez les femmes au-dessus de 40 ans, particulièrement si elles ont eu un traitement précédent non réussi (Godwin, 2004).

3.7.2. La procédure de transfert embryonnaire

La femme n'a pas besoin de jeûner puisque l'anesthésie générale n'est pas habituellement exigée. L'embryologiste prend tous les embryons pour être transférés par une canule mince en plastique fixée dans une seringue et les remet au clinicien. Le clinicien passe doucement la canule dans la cavité utérine dans l'os cervical et expulse les embryons, avec une goutte du milieu de culture. La canule est alors enlevée. La patiente est invitée à revenir à l'hôpital pour une prise du sang pour un test de grossesse si ses règles ne commencent pas dans les 12 jours après le transfert d'embryons (Godwin, 2004).

3.8. Phase lutéale

Le GnRHa a induit le bloc de sécrétion de LH pendant la phase lutéale conduisant à la suppression de la pulsativité de progestérone (Kubic, 1986). La phase lutéale est en général soutenue par un traitement progestatif pendant 15 jours (Zoran and Saval, 1999). La supplémentation de progestérone est commencée à la soirée, après collection d'ovocyte ou le jour après (Godwin, 2004).

4. Diagnostic et surveillance de la grossesse au début

La grossesse débutante, dont le premier signe est la persistance de l'aménorrhée, est affirmée par le dosage d'hCG vers le 15^e jour après la ponction. Une échographie, faite dès la 4^e semaine de grossesse, permet le contrôle de l'évolutivité et le dépistage précoce des grossesses multiples et ectopique (Zoran and Saval, 1999).

5. Méthodes d'évaluation de la viabilité des pré-embryons

5.1. Évaluation de la morphologie

Chaque blastomère doit posséder un seul noyau, avoir la taille et la forme égales, maintenir la couleur et la granularité uniformes, et occuper la majeure partie de l'espace dans la zone pellucide (figure V.4) (Keel *et al.*, 2000).

Les Pré-embryons dans l'étape de blastocyste doivent avoir une seule cavité, une masse intérieure visible de cellules, des cellules trophoblastiques régulières, et à une expansion adéquate avec des nombres convenables de cellules (Keel *et al.*, 2000). L'épaisseur de la zone pellucide, la membrane glycoprotéique qui entoure le pré-embryon, semble prévoir le potentiel de pré-embryon (Cohen, 1992).

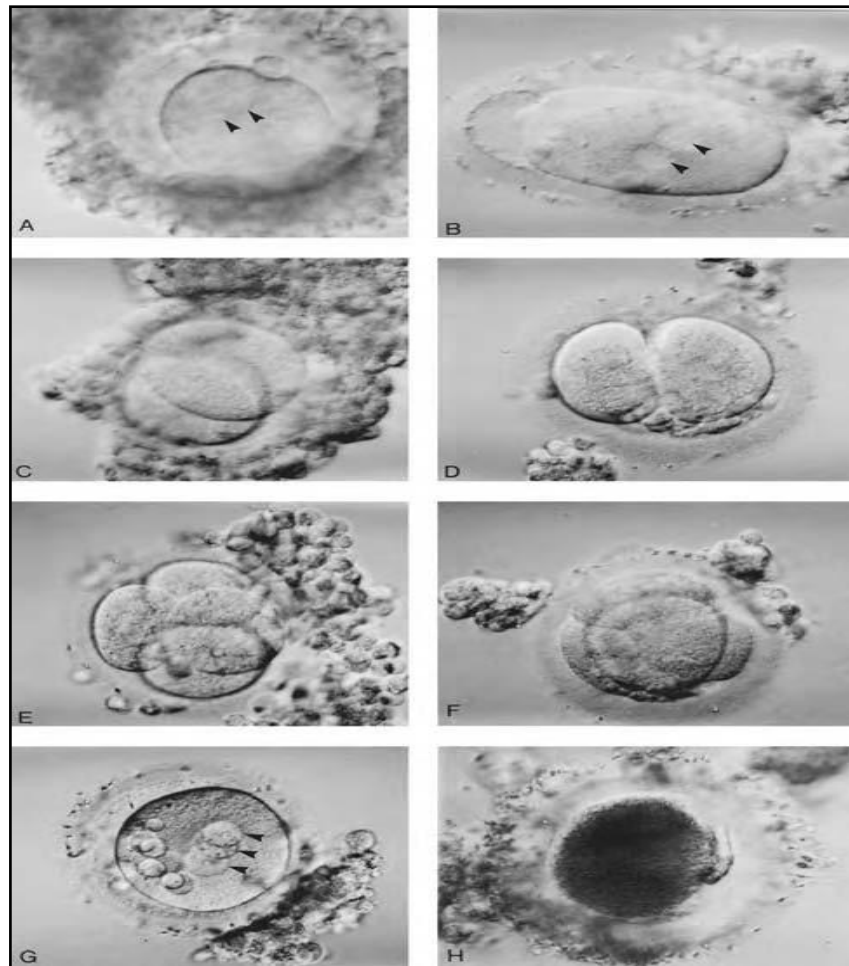


Figure V.4. Photomicrographes des ovocytes fécondés et des pré-embryons humains. (A et B) : Fécondation normale (un pronucléus masculin et un pronucléus femelle dans l'ooplasm, les pointes de flèches). L'ovocyte fécondé A est d'excellente qualité tandis que l'ovocyte fécondé B peut être dégradé pour les dispositifs morphologiques tels que la forme irrégulière, cytoplasme rétréci et ne fait pas remplir la zone pellucide, et granularité cytoplasmique inégale. (C et D) : pré-embryons de deux-cellule. Pré-embryon C est proche de la morphologie parfaite tandis que le pré-embryon D peut être dégradé pour des particularités comprenant les blastomères inégaux, la granularité cytoplasmique inégale, et les fragments cytoplasmiques. (E et F) : pré-embryons de quatre cellules. Le Pré-embryon E est proche de la morphologie parfaite tandis que le pré-embryon F peut être dégradé pour des particularités comprenant les blastomères inégaux, la granularité cytoplasmique inégale, et les fragments cytoplasmiques. Ovocyte humain anormalement fécondé de (G). Cet ovocyte montre trois pronucléus (pointes de flèches) qui sont distinguables des vacuoles cytoplasmiques car le pronucléus possède des nucleoles tandis que les vacuoles sont vides. (H) : Ovocyte atreétique 16 heures de poste-insémination. Cet ovocyte était postmaturé à la ponction (cellules de cumulus groupées en masse compacte par note à l'arrière-plan) et détérioré rapidement (Keel *et al.*, 2000).

On utilise des critères morphologiques qui classent généralement les pré-embryons par catégorie dans une de quatre ou cinq catégories. Les pré-embryons peuvent être classifiés en utilisant des termes tels qu'excellent, bons, passables, ou mauvais ou en employant des nombres sur une échelle de 1 à 4 ou 1 à 5 (Keel *et al.*,2000).

Un pré-embryon de la catégorie 1, représentant une parfaite morphologie, aurait les blastomères égaux de taille sans fragments cytoplasmiques. Un pré-embryon de la catégorie 2 aurait des blastomères de taille égale et des fragments mineurs. Les pré-embryons avec des blastomères distinctement inégaux sont la catégorie 3, et ceux avec une fragmentation modérée à forte seraient de la catégorie 4. La catégorie 5 des pré-embryons ressemble aux masses amorphes avec peu de blastomères de n'importe quelle taille et avec une fragmentation importante ou complète (Keel *et al.*,2000).

5.2. Évaluation des taux de fragmentation

On observe généralement des taux de fragmentation pour les pré-embryons humain normaux post-fécondés comme suit :

- 2 cellules entre 22 et 44 heures ;
- 4 cellules entre 36 et 50 heures ;
- 8 cellules entre 48 et 72 heures ;
- morula entre 72 et 96 heures ;
- blastocyste plus que 120 heures.

Les fragmentations inégales (c.-à-d., 3, 5, ou 7 cellules) peuvent être observées de temps en temps pendant la division méiotique ; cependant, la fragmentation inégale et persistante serait considérée une anomalie.

Les pré-embryons tombent dans quatre catégories basées sur la morphologie :

- catégorie 4, blastomères également symétriques ;
- catégorie 3, blastomères inégaux avec 10% ou moins de fragmentations ;
- catégorie 2, fragmentation de 10 à 50% ;
- catégorie 1, plus que de 50%, de fragmentation, ou ceux ne montrant pas la fragmentation.

Giorgetti *et al.* (1995) ont conçu une échelle de 4 points dans laquelle les pré-embryons ont reçu 1 point pour chacun des attributs suivants : fragmentation en étape de 4 cellules, absence des blastomères irréguliers, et la fragmentation de moins de 20% de la surface embryonnaire, les pré-embryons qui ne se sont pas fragmentés n'ont reçu aucun point et n'ont produit aucune grossesse.

L'ICSI a changé pour toujours la gestion de l'infertilité de facteurs masculins. L'enthousiasme en appliquant ICSI devrait cependant être tempéré parce qu'il n'y a aucune donnée à long terme sur le bien-être de la progéniture et ce sera un long temps avant que ceci devienne disponible, certainement pas dans notre vie.

Il est donc important que chaque praticien applique ce traitement avec le plus grand degré de responsabilité et de bonne foi (Godwin, 2004).

Un système précis pour l'évaluation de la viabilité pourrait réduire le nombre de pré-embryons transférés par patient, réduire le potentiel de risque élevé, la grossesse multiple, et prévoir une certaine prévision de succès d'implantation (Keel *et al.*, 2000).

Partie pratique

Chapitre VI

Patients, matériels et méthodes et analyse statistique

1. Patients, matériels et méthodes

1.1. Patients

Les patients sont des couples candidats pour l'ICSI dans le centre de médecine de reproduction, clinique Ibn Rochd à Constantine, Algérie, recrutés pendant la période de Septembre à Décembre 2011. La durée de stérilité chez ces patients est supérieure à une année. Au total, 26 couples ont été analysés.

1.2. Prélèvement du sperme

Le sperme est obtenu par masturbation après une période d'abstinence entre 3 et 5 jours. Le prélèvement est fait le jour de la ponction ovocytaire.

1.3. Préparation du sperme par la Centrifugation en gradient de densité

La préparation du sperme pour l'analyse des paramètres standards et l'ICSI et le test de fragmentation de l'ADN spermatique (FAS) se fait après sa liquéfaction à la température ambiante pendant au moins une heure.

Les solutions utilisées dans la centrifugation sont portées à la température ambiante et la manipulation se fait dans un tube conique à centrifugation.

- 100µl de tampon PureSperm[®] sont ajoutés à 900µl de PureSperm[®] 100 (voir annexe 1) pour obtenir 1000µl de PureSperm[®] 90%.
- 550 µl de tampon PureSperm[®] sont ajoutés à 450µl de PureSperm[®] 100 (voir annexe 1) pour obtenir 1000µl de PureSperm[®] 45%.
- A l'aide d'une pipette stérile, 1ml de sperme liquéfié est déposé doucement au dessus de deux couches de gradients (90% et 45%).
- Le tube contenant le gradient et le sperme est centrifugé à 300g pendant 25 minutes.
- A l'aide d'une pipette stérile, le surnagent est éliminé par un mouvement circulaire. Il reste le culot et 2-3 mm de PureSperm[®] à 90%.
- Le culot de sperme est transféré à un nouveau tube conique de centrifugation et on ajoute 200µl de solution de lavage (FertiCult Flushing medium[™], voir annexe 2).
- Le tube est centrifugé à 500g pendant 10 minutes.
- La solution de lavage est aspirée.
- Le milieu de culture FertiCult[™] IVF medium (voir annexe 3) est ajouté au culot.

1.4. Analyse des paramètres standards de sperme

1.4.1. La numération de spermatozoïdes

La numération est faite en utilisant la chambre de Makler (voir annexe 7).

- Une dilution au 1/20ème est réalisée à partir de l'échantillon bien mélangé en diluant 50µl du sperme liquéfié avec 950 µl du milieu de dilution (milieu de culture).
- Après mélange soigneux de l'échantillon dilué, une goutte calibrée de 10 ou 20 µl est introduite dans la chambre de Makler et recouverte par une lamelle.
- La chambre est ensuite laissée 5 minutes environ dans une enceinte humide pour empêcher l'évaporation. Pendant ce temps, les cellules sont sédimentées.
- Les spermatozoïdes sont ensuite comptés en utilisant un microscope à contraste de phase (voir annexe 8), à un grossissement final de x 200 ou x 400. Seuls les spermatozoïdes (cellules matures avec un flagelle) sont comptés et non les flagelles ou les têtes isolés.
- Le nombre de spermatozoïdes est calculé dans 10 carrés, leur nombre représente leur concentration en millions par ml. Dans le cas d'une oligospermie, le nombre de spermatozoïdes doit être compté dans tous les carrés de la grille. Leur nombre représente leur concentration en centaines de milliers par ml.

1.4.2. La mobilité

La mobilité est déterminée selon les normes de l'OMS (WHO, 1999) en calculant la valeur en pourcentage a + b (a: spermatozoïdes rapides et progressifs ; b: spermatozoïdes lents progressifs).

1.5. Procédure de l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI)

1.5.1. Phase de blocage et superovulation

Les patientes ont subi le traitement hormonal suivant :

- Les sécrétions hormonales des patientes ont été bloquées par un analogue agoniste de GnRH (Decapeptyl[®]) selon un protocole court ou long. Si le protocole est long l'injection de Decapeptyl[®] se fait soit à raison de 3.75 mg dans le 21ème jour du cycle soit à raison de 0.1mg pendant 14 jours à partir de 21ème jour du cycle. Si le protocole est court l'injection (0.1mg) se fait à partir du 2^{ème} jour du cycle.
- La stimulation ovarienne est réalisée par un FSH recombinant (Purgon[®]) 15 jours après l'injection de Decapeptyl[®] dans le protocole long (200 mg) et dans le 3^{ème} jour du cycle dans le protocole court (200 mg).
- La surveillance de stimulation est réalisée à partir du 8^{ème} jour par l'échographie et par le dosage d'œstradiol.

1.5.2. Ponction ovocytaire

- Lorsque le follicule atteint au moins 18 mm de diamètre, l'ovulation est déclenchée par un hCG recombinant (Ovitrelle®) 6500UI soit 250 µg.
- La ponction se fait 36 heures après l'injection de l'Ovitrelle® (100 µg pour un follicule).
- Les follicules sont lavés dans un milieu de lavage, le FertiCult™ Flushing medium (voir annexe 2).
- La décoronisation (éclosion) des follicules est réalisée par l'ajout de 150µl d'hyaluronidase (Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium, voir annexe 4).

1.5.3. La microinjection

- Une microgoutte de 10µl de Polyvinylpyrrolidone : PVP (10 % PVP in FertiCult Flushing Medium, voir annexe 5) est étendue dans la boîte Pétri.
- 1µl de la suspension de sperme préparée est placé au milieu de cette gouttelette de PVP.
- 4 à 8 gouttelettes de 5µl de milieu de culture des ovocytes, FertiCult™ IVF medium (voir annexe 9), sont mises autour de gouttelette de PVP contenant les spermatozoïdes (la goutte de PVP est au centre de la boîte Pétri entourée par les gouttes de FertiCult™ IVF medium).
- Environ 4-5 ml de paraffine liquide ou huile minéral (FertiCult Miniral Oil, voir annexe 6) sont doucement versés dans la boîte pour couvrir ces gouttelettes.
- La boîte est alors retournée à l'incubateur à 37°C pendant environ 30 minutes avant de transférer les ovocytes dans les gouttelettes de culture prêtes pour l'ICSI.
- Après injection (par le biais d'un microscope OLYMPUS), les ovocytes fécondés sont mis dans l'incubateur (37°C, 5% de CO₂) jusqu'au 3^{ème} jour (J3).

1.6. Evaluation de la fécondation et qualité des embryons

- Les pronoyaux sont vérifiés 18 à 20 heures après la micro injection.
- La qualité morphologique des embryons est évaluée aussi 24 heures après la fécondation. Le tableau VI.1 montre les critères utilisés dans la classification des embryons par le laboratoire de PMA de clinique Ibn Rochd (Ebner *et al.*, 2001).
- Un maximum de trois embryons est transféré 2 à 3 jours après l'ICSI. 02 patientes ont été traitées par la FIV et l'ICSI et les embryons transférés sont celles de la FIV.
- Les embryons surnuméraires y compris les blastocystes sont congelés.

Tableau VI.1. Classification des embryons suivie par clinique Ibn Rochd (Ebner *et al.*, 2001).

Type des embryons	Blastomères	Embryons avec fragments cytoplasmiques
a	Egaux et réguliers	Absence
b	Egaux et réguliers	< 25%
c	Inégaux	26-50%

1.7. Phase lutéale et teste de grossesse

- La phase lutéale est soutenue par la progestérone (600 mg/ jour) juste après la ponction et jusqu'au jour du test de grossesse (après 15 jours).
- Le test de grossesse positif de β HCG correspond à un taux de β HCG égal à 10UI/L.
- La grossesse clinique été définie par la présence d'un sac gestationnel intra-utérin 3 à 4 semaines après le test des β HCG.

1.8. Test de fragmentation de l'ADN spermatique par SCD

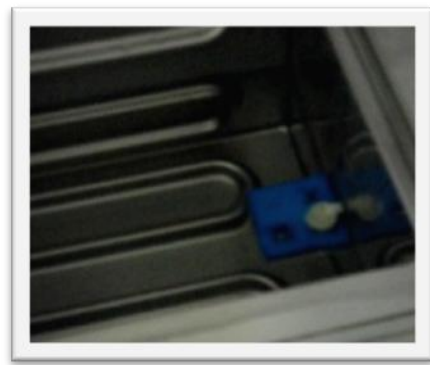
Cette méthode est basée sur le test de dispersion de la chromatine spermatique ou SCD : Sperm Chromatin Dispersion (Fernandez *et al.*, 2003, 2005). Des spermatozoïdes intacts non fixés (frais, congelés/ décongelés, dilués ou non) sont immergés dans un microgel d'agarose inerte (qui permet le travail avec des spermatozoïdes non fixés) sur une lame prétraitée. Un traitement initial à l'acide dénature l'ADN de ces spermatozoïdes à ADN fragmenté. La solution de lyse supprime ensuite la plupart des protéines nucléaires et, en l'absence de rupture massive d'ADN, produit des nucléotides avec de grands halos de boucles d'ADN, émergeant d'un noyau central. En revanche, les spermatozoïdes avec un ADN fragmenté ne développent pas un halo de dispersion ou bien celui-ci est petit. La manipulation suit les étapes suivantes :

1.8.1. Dénaturation et lyse

- La solution de lyse est mise à la température ambiante.
- Le sperme est dilué dans un milieu de culture pour obtenir un maximum de concentration de 20 M/ml.
- L'agarose est fluidifié en plongeant le tube eppendorf (100 μ l) pendant environ 5 minutes dans l'eau à 95-100°C (figure VI.1).



A



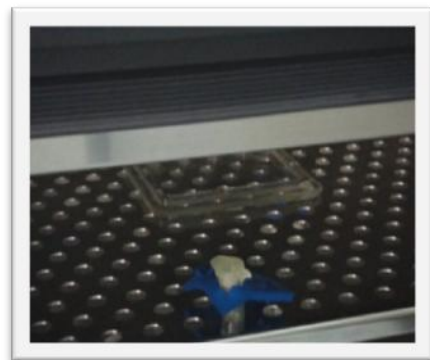
B

Figure VI.1. Fluidification du gel. A : bain marie, B : Tube de gel dans le flotteur.

- Le tube eppendorf est passé à une étuve sèche à 37 °C pendant 5 minutes pour équilibrer la température (figure VI.2).



A



B

Figure VI.2. Equilibration de la température. A : Etuve, B : Gel dans l'étuve.

- 50 µl de sperme est ajouté dans le TPE d'agarose et mélangé délicatement à l'aide d'une pipette et maintenu dans le 37°C (figure VI.3).



A



B

Figure VI.3. Mélange sperme-gel. A : Prélèvement du sperme, B : Mélange du sperme avec le gel.

- Une goutte de 8 μ l de la suspension cellulaire est déposée sur le puis du coté traité de la lame, et une lamelle 24x24 est posée par-dessus (figure VI.4). Tout au long de ce processus, la lame doit rester horizontale.



Figure VI.4. Etalement de la suspension cellulaire. A : prélèvement de la suspension, B : dépôt sur le puis, C : couverture par lamelle.

- La lame est mise sur une surface froide (4°C) et placée dans le réfrigérateur pendant 5 minutes, temps nécessaire à la gélification de l'échantillon.
- La lame est ressortie du réfrigérateur et la lamelle est retirée délicatement en la faisant glisser de manière verticale (figure VI.5).

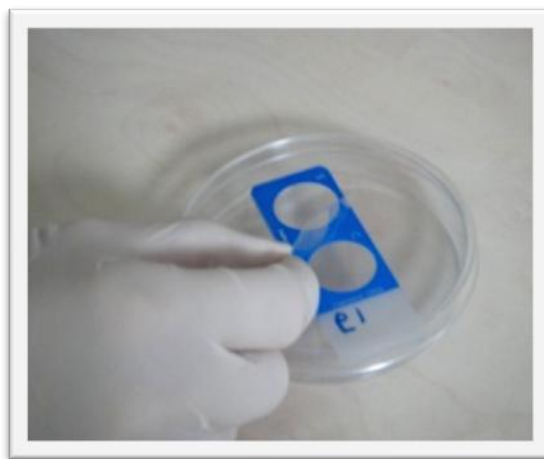


Figure VI.5. Glissement de lamelle verticalement.

- Le puis est bien rempli par la solution 1 dénaturante et incubé pendant 7 minutes (figure VI.6). La solution est versée en inclinant la lame.



A



B

Figure VI.6. La dénaturation. A : solution 1 dénaturante, B : dépôt sur la suspension.

- Le puis est bien rempli par la solution 2 de lyse et incubé pendant 20 minutes (figure VI.7). La solution est versée de la même façon.



A



B

Figure VI.7. La lyse. A : Solution 2 de lyse, B : dépôt sur la suspension.

- La lame est rincée en abondance par l'eau distillée pendant 5 minutes puis l'eau est versée de la même façon (figure VI.8).

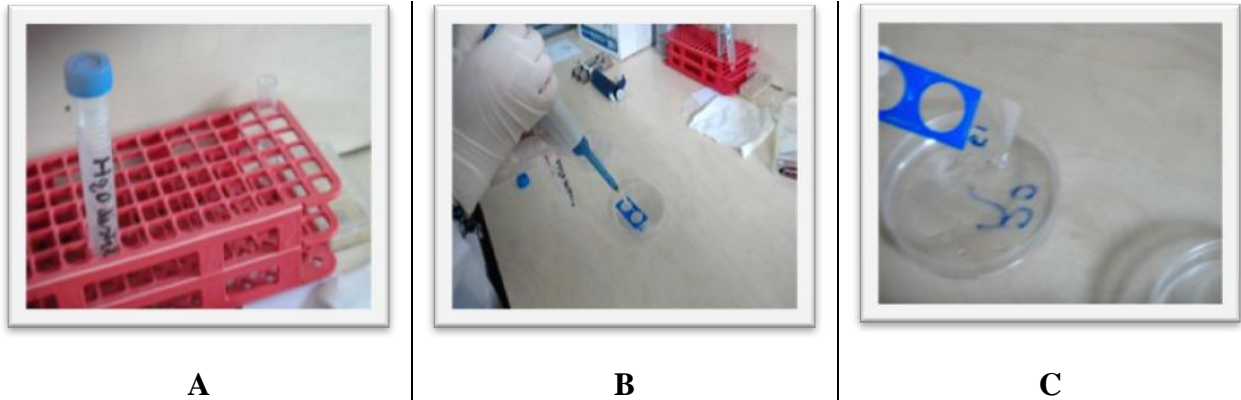


Figure VI.8. Le rinçage. A : eau distillée, B : dépôt sur le puis, C : Versement de l'excès d'eau

- La lame est rincée par l'éthanol 70% pendant 2 min, puis par l'éthanol 100% pendant 2 minutes (figure VI.9).



Figure VI.9. Fixation par l'alcool. A : Ethanol 70%, B : Ethanol 100%.

- La lame est mise dans une porte lame et laissée séchée.

1.8.2. Coloration

- La lame est placée horizontalement dans une boîte pétrie.
- La solution 3 correspond au colorant 1 est ajoutée dans le puis et incubée pendant 7 minutes, puis est versée de la même façon (figure VI.10, A-D).
- La solution 4 correspond au colorant 2 est ajoutée dans le puis et incubée pendant 7 minutes puis est versée de la même façon (figure VI.10, E-H).

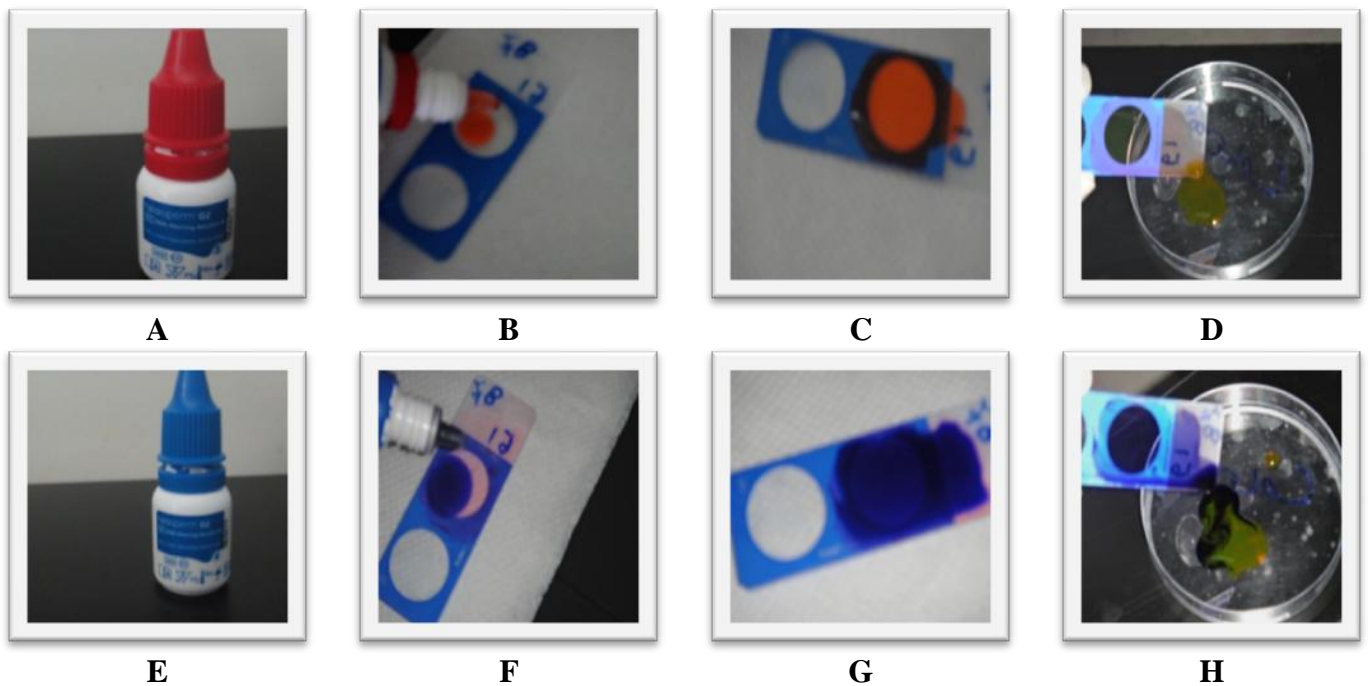


Figure VI.10. Coloration Diff-Quik. A : colorant 1 ; B : dépôt sur la préparation ; C : Incubation ; D : Versement ; E : colorant 1 ; F : dépôt sur la préparation; G : Incubation ; H : Versement.

- La lame est laissée séchée à la température ambiante.
- La visualisation se fait sous un microscope à fond clair (MOTIC B1 Series) avec un grossissement de 20x à 40x par l'objectif (figure VI.11).

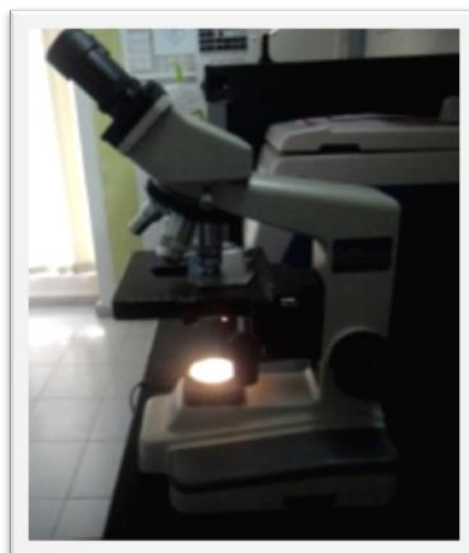


Figure VI.11. Microscope photonique à fond clair (MOTIC B1 Series).

➤ On Compte entre 300 à 500 spermatozoïdes et on calcule :

$$IFA (\%) = \frac{(\text{Fragmenté} + \text{Dégradé})}{\text{Total}} \times 100$$

2. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel de Graphpad Prism 6 (www.graphpad.com). Les données statistiques sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (*The standard error of the mean* ou l'erreur standard de la moyenne).

Les résultats de la technique de reproduction sont présentés par la fécondation des ovocytes matures injectés, la qualité des embryons, la grossesse biochimique (positive ou négative), la grossesse clinique (positive ou négative), naissance ou avortement.

Une étude descriptive de l'échantillon de patients étudié est faite et comporte le traitement des données concernant les couples candidats à l'ICSI y compris leur antécédents thérapeutiques ainsi que les caractéristiques du sperme après la centrifugation par gradient de densité (CGD), la qualification des embryons et le devenir de l'ICSI.

Les patients sont réparties en deux catégories : ceux qui ont un taux de fragmentation d'ADN spermatique inférieur ou égal à 30% et ceux qui ont un taux supérieur à 30%. Ce taux de fragmentation est exprimé par l'indice de fragmentation d'ADN spermatique ($IFA \leq 30\%$ ou $IFA > 30\%$). Ce seuil de 30% est défini par 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.

Pour la comparaison des différents paramètres quantitatifs entre les deux groupes, le test t de Student et le test de Mann Whitney sont appliqués. Ces paramètres quantitatifs sont :

- l'âge des hommes ;
- l'âge des femmes en cas de présence ou d'absence de grossesse biologique ;
- le volume du sperme ;
- la numération des spermatozoïdes;
- la mobilité des spermatozoïdes,
- la fécondation des ovocytes ;
- la qualité des embryons entre les deux groupes et au sein d'un même groupe.

Pour la comparaison des différents paramètres qualitatifs entre les deux groupes, le test exact de Fisher est appliqué avec un intervalle de confiance (IC) de 95% en calculant le risque de cote (RC ou OR pour *odds ratio*). Les paramètres qualitatifs sont la présence ou l'absence :

- des antécédents de traitements préalables par PMA pour au moins une fois (IAC, FIV et ICSI) ;
- de grossesse biochimique et clinique ;
- d'avortement après grossesse clinique ;
- de naissance.

L'âge des hommes avec un seuil de 35 et 40 ans, le tabagisme sont également étudiés.

La corrélation entre l'IFA et les différents paramètres liés aux couples candidats pour l'ICSI est étudiée avec un intervalle de confiance de 95% tout en calculant le coefficient r de Pearson.

Ces différents paramètres sont :

- âge des hommes ;
- volume du sperme ;
- numération des spermatozoïdes ;
- mobilité des spermatozoïdes ;
- fécondation des ovocytes ;
- qualité des embryons (a+b).

La corrélation des âges des femmes avec le taux de fécondation des ovocytes, pour différentes valeurs de FAS est également étudiée.

L'étude de la relation entre le métier paternel et l'IFA n'est put être effectué puisque le recours à la PMA en Algérie est gouverné par la capacité financière des couples. Ainsi certains fonctionnaires sont privilégiés par rapports au autres, les militaires par exemple se bénéficient d'un soutien financière sous forme de conventions.

Pour tous les tests statistiques utilisés, le risque d'erreur alpha a été fixé à 5%, les différences sont donc considérées comme significatives si la valeur de p est inférieure à 0,05.

Chapitre VII

Résultats et Discussion

1. Caractéristiques générales des couples étudiés

Le tableau VII.1 renseigne sur différentes caractéristiques générales des 26 couples inclus dans l'étude.

Tableau VII.1. Caractéristiques générales des couples étudiés, du sperme, de la FAS, et des résultats de l'ICSI.

	Paramètre		Moyenne \pm SEM ou pourcentage
Les sujets	Age	Hommes	37,500 \pm 0,879 ans
		Femmes	31,423 \pm 0,88 ans
	Stérilité primaire		88,462 %
	Stérilité secondaire		11,538 %
	Durée de la stérilité		6,040 \pm 0,546 ans
	Cause féminine de la stérilité		15,385 %
	Cause masculine de la stérilité		46,154 %
	Cause féminine et masculine de la stérilité		38,462 %
	Tabagisme		28,571 % ^a
	Traitement antérieur par PMA		40,000 %
Caractéristiques standard du sperme	Volume		2,854 \pm 0,258 ml
	Numération des SPZ		15,46 \pm 5,018 10 ⁶ /ml
	Mobilité des SPZ		46,14 \pm 3,272 % ^b
IFA	IFA dans tout l'échantillon		25,557 \pm 2,492 %
	IFA \leq 30%		18,289 \pm 2,060 %
	IFA $>$ 30%		39,257 \pm 2,030 %
	Patients à IFA \leq 30%		65,385 %
	Patients à IFA $>$ 30%		34,615 %
Ovocytes et embryons	Ovocytes matures		85,813 \pm 3,230
	Embryons matures		81,022 \pm 3,651 %
	Embryons de qualité (a+b)		71,190 \pm 4,592 %
Devenir de l'ICSI	Grossesse biologique		50,000 %
	Grossesse clinique		100,000 %
	Avortement		25,000 %
	Naissance		66,667 %

a: seulement 14 patients ont pu être interrogés à ce sujet.

b: données disponibles pour 22 patients. Chez un patient elle n'a pas été estimée. Chez les autres, la numération était très faible ce qui a empêché de calculer la mobilité.

L'âge moyen des hommes est de $37,500 \pm 0,879$ ans, et celui des femmes est de $31,423 \pm 0,88$ ans. La majorité de ces couples souffre de stérilité primaire: 88,462% contre seulement 11,538% qui souffrent d'une stérilité secondaire. En effet, bien que la stérilité secondaire soit 5 fois plus fréquente que la stérilité primaire (10,5% de la population mondiale en 2010 versus 1,9%) (Mascarenhas *et al.*, 2012), le recours à une technique de PMA est logiquement plus fréquent en cas de stérilité primaire, comme ce que nous constatons ici dans notre échantillon.

La durée moyenne de la stérilité est de $6,040 \pm 0,546$ ans. Les étiologies de stérilité varient d'une cause liée uniquement à la femme (15,385 %), à une cause liée seulement à l'homme (46,154 %) ou bien aux deux conjoints (38,462 %). Les chiffres concernant l'étiologie de la stérilité sont très variés d'une année à l'autre et d'une population à l'autre. Une étude réalisée par l'OMS parmi 8 500 couples infertiles a retrouvé une étiologie féminine dans 37 % des cas, une étiologie masculine dans 8 % des cas et une étiologie à la fois féminine et masculine dans 35 % des cas (WHO, 1992). Les 20 % des couples restants dans cette étude ont débuté une grossesse ou ont présenté une infertilité inexplicée.

Dans notre échantillon, 40% de ces couples ont déjà eu recours à un traitement par PMA. Le tabagisme a été retrouvé chez 04 hommes parmi les 14 interrogés (soit 28,571%).

2. Indice de fragmentation d'ADN spermatique (IFA)

La figure VII.1 illustre certaines observations microscopiques des spermatozoïdes étudiés par le test SCD. Ils ont été traités et colorés par le réactif d'Halosperm[®].

La moyenne de l'IFA dans tout l'échantillon est de $25,557 \pm 2,492\%$. Parmi les 26 hommes, neuf (soit 34,615%) ont un IFA>30%. Dans ce groupe de patients, la moyenne de l'IFA est de $39,257 \pm 2,030\%$ alors que chez les patients appartenant au groupe d'IFA≤ 30% la moyenne est de $18,289 \pm 2,060\%$.

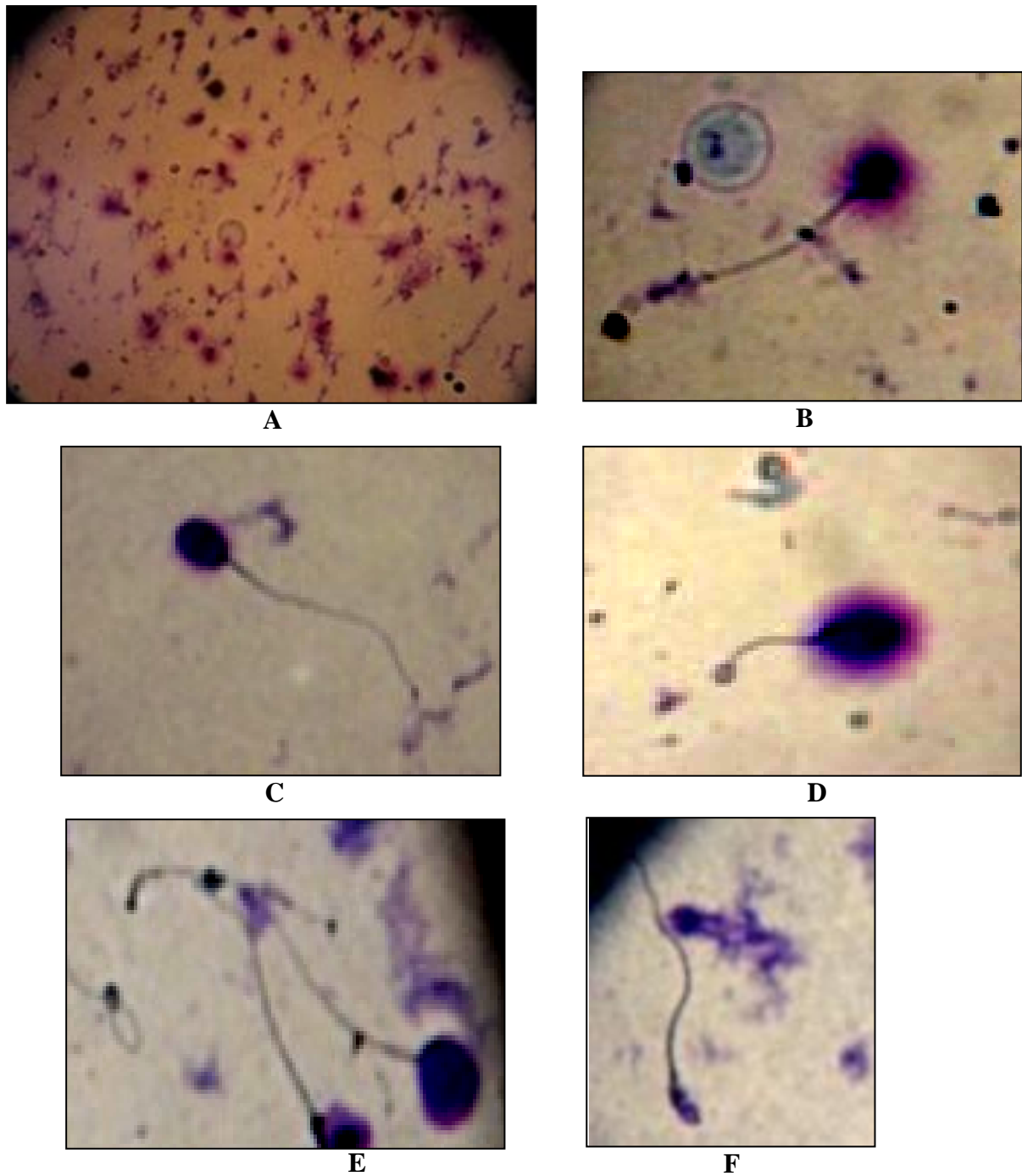


Figure VII.1. Spermatozoïdes traités et colorés par l'Halosperm[®].

- A : Vue globale de plusieurs Spermatozoïdes (objectif 20 X).
- B : Spermatozoïde normal sans fragmentation d'ADN (grand halo) (objectif 40 X).
- C : Spermatozoïde normal avec fragmentation d'ADN (sans halo) (objectif 40 X).
- D : Spermatozoïde normal (flagelle enroulé) sans fragmentation d'ADN (objectif 40 X).
- E : Spermatozoïdes anormaux (macrocéphalie) avec fragmentation d'ADN (objectif 40 X).
- F : Spermatozoïde avec ADN dégradé (objectif 40 X).

3. Etude de l'influence de l'âge des hommes sur l'IFA

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'âge des hommes et l'IFA (figure VII.2).

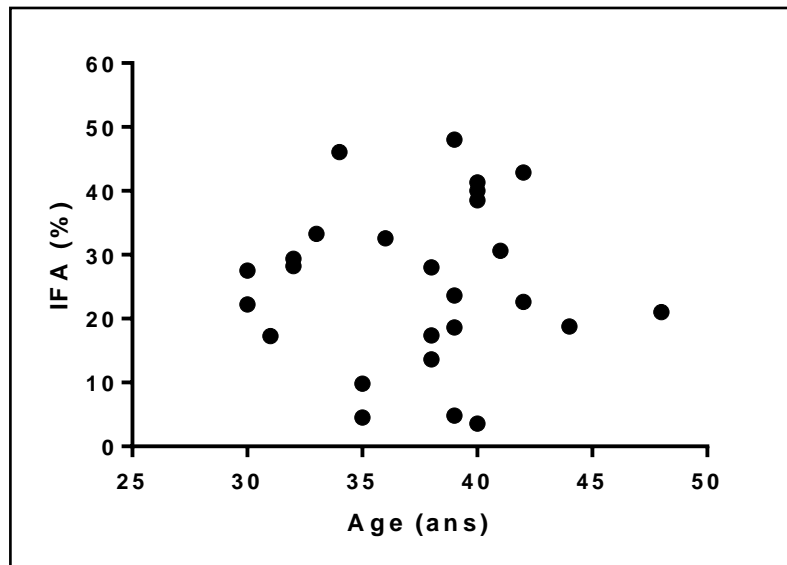


Figure VII.2. Corrélation de l'IFA avec l'âge des hommes.

De plus, la comparaison entre la moyenne d'âge chez les hommes ayant un IFA $\leq 30\%$ et celle des hommes ayant un IFA $> 30\%$ ne montre pas de différence significative.

Nous avons tenté de déceler une éventuelle influence de l'âge sur l'IFA en divisant les hommes en deux autres groupes selon le seuil d'âge: 35 ans. La recherche d'une éventuelle différence d'appartenance à un groupe d'âge selon le groupe IFA n'a montré aucun résultat significatif. Nous avons refait le même test mais en choisissant un autre seuil de subdivision des hommes selon l'âge qui est le seuil de 40 ans. Malgré cela, nous n'avons trouvé aucun résultat significatif.

Nous remarquons donc que dans notre échantillon, l'âge des hommes est un facteur non influent sur l'IFA. Ce même résultat a été trouvé par Sun *et al.* (1997) en utilisant la technique de TUNEL.

Cependant, des augmentations de la fragmentation de l'ADN spermatique liées à l'âge ont été précédemment reportées (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 l'IFA était bas ($14,7\% \pm 9,9\%$) et correspondait à un excellent potentiel de fertilité.

Dans notre étude l'indépendance du facteur âge et de l'IFA pourrait être expliquée par la jeunesse relative des hommes dans notre échantillon (limites d'âge: [30 – 48 ans]) où on remarque l'absence des hommes dans les cinquantaines d'âge.

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).

4. Comparaison du nombre d'antécédents de recours à une technique de PMA selon l'IFA

On note que les causes d'échec de la technique de PMA étaient soit l'absence totale de grossesse chez tous ces couples soit la survenue d'un avortement (un cas dans le premier groupe suite à une ICSI et deux cas dans le deuxième groupe, un cas suite à FIV et un autre suite à une ICSI).

Cependant, il est maintenant bien connu que la fragmentation de l'ADN spermatique est négativement corrélée à la fertilité masculine (Zini *et al.*, 2001a ; Smit *et al.*, 2006 ; Giwercman *et al.*, 2010) et aux anomalies du sperme (Moskovtsev *et al.*, 2009). L'absence de différence du nombre de tentatives de PMA entre nos deux groupes de patients (IFA \leq 30% et IFA $>$ 30%) pourrait être due à la petite taille de notre échantillon ou bien à la variabilité des techniques utilisées à chaque fois pour chaque couple (FIV, IAC ou ICSI).

On a documenté un certain nombre de cas dans lesquels les couples ont eu des essais échoués multiples après injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI), même en utilisant des ovocytes de donatrices, et il a été constaté que la fragmentation de l'ADN spermatique était au-dessus de seuil pour la probabilité de moins de 1% d' une grossesse réussie (Evenson *et al.*, 2002).

5. Etude de l'influence du tabagisme des hommes sur l'IFA

La comparaison des deux groupes de patients (IFA \leq 30% et IFA $>$ 30%) par rapport à la présence ou l'absence de tabagisme chez les hommes n'a pas montré de différence significative.

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 (Spano *et al.*, 1998; Potts *et al.*, 1999), nous n'avons pas trouvé de différence d'antécédent de tabagisme entre nos deux groupes de patients. Nos résultats pourraient être expliqués par la petite taille de l'échantillon, d'autant plus que la comparaison n'a inclus que 14 patients qui sont ceux qui ont pu être interrogés à ce sujet, parmi les 26 candidats. Nous pouvons noter, tout de même, que les 4 patients fumeurs souffrent d'asthénotéatospermie, d'oligoasthénospermie, d'oligospermie ou d'asthénospermie.

L'éjaculat des hommes fumeurs subit un stress oxydant comme il est indiqué 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 antioxydantes (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 l'IFA 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 l'IFA 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).

6. Etude de la relation entre l'IFA et différents paramètres standard du sperme

6.1. IFA et Volume du sperme

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les valeurs des volumes du sperme et l'IFA dans l'échantillon étudié.

D'un autre côté, la comparaison des moyennes du volume du sperme entre les deux groupes (IFA \leq 30% et IFA $>$ 30%) ne montre pas de différence significative.

6.2. IFA et Numération et mobilité des spermatozoïdes

Nous avons trouvé une claire corrélation négative entre la numération des spermatozoïdes dans l'éjaculat et l'IFA.

De même, la différence entre les moyennes de numération des spermatozoïdes est significative entre le groupe de IFA \leq 30% et le groupe d'IFA $>$ 30% (figure VII.3).

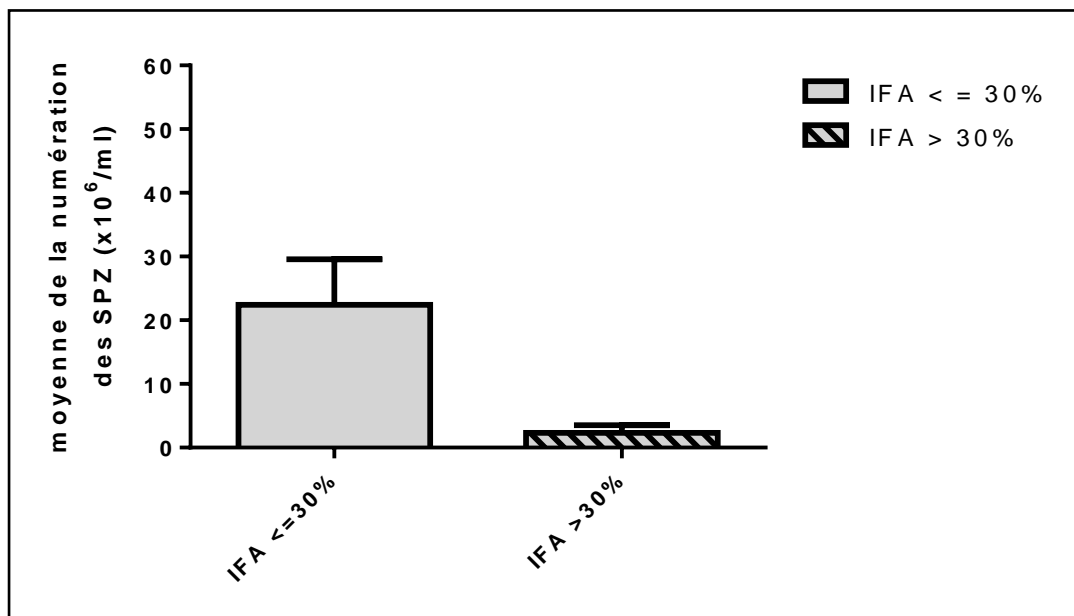


Figure VII.3. Comparaison des moyennes de la numération des spermatozoïdes selon l'IFA.

Nous avons trouvé une corrélation négative entre la mobilité des spermatozoïdes et l'IFA.

Cependant la comparaison de la moyenne de mobilité des spermatozoïdes entre les deux groupes d'IFA n'a pas montré de différence significative.

Comme nous pouvons le remarquer, les moyennes des numérations et des mobilités des spermatozoïdes chez nos patients sont au dessous des valeurs normales, selon l'OMS. Ceci s'explique par le fait que la majorité de ces patients (46,154 %) souffrent de stérilité masculine dont le traitement de choix est bien évidemment l'ICSI.

Notre étude a montré qu'il y a une corrélation négative significative entre d'une part les paramètres standards (numération et mobilité) et d'autre part l'IFA. Cependant, le volume du sperme n'est pas corrélé à l'IFA. Pour ce qui est de la morphologie des spermatozoïdes, elle n'a pas été testée, l'existence des cas d'asthénospermie est connue à partir des résultats d'analyses préalables.

En effet, l'existence de corrélation entre les paramètres standards (numération et 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).

Zini *et al.* (2001b) ont identifié une corrélation négative entre le pourcentage des spermatozoïdes avec un ADN dénaturé et la mobilité ($r = -0.51$; $p < 0,0001$) ou la numération ($r = -0,39$; $p < 0,05$). La corrélation négative été établie aussi entre l'HDS (high DNA stainability), qui représente une autre population distincte dans le sperme qui caractérise les spermatozoïdes non matures avec la condensation incomplètes de la chromatine, et la concentration et le pourcentage des spermatozoïdes avec une mobilité progressive (Bungum *et al.*, 2004).

Une étude réalisée par Evenson *et al.* (1999) à montré une corrélation entre le taux des cellules avec un ADN dénaturé mesuré par SCSA et la mobilité progressive ($r = -0.23$; $p < 0,05$).

Zhang *et al.* (2010) ont utilisé les tests SCD et TUNEL pour montrer une faible relation linéaire entre la numération et l'IFA ($r = -0,272$ dans la SCD, $r = -0.294$ dans le TUNEL), cependant, le rapport linéaire entre la mobilité progressive et la fragmentation d'ADN spermatique était modéré ($r = -0,477$ dans la SCD, $r = -0,526$ dans le TUNEL).

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).

Les hommes avec une faible mobilité et une morphologie anormale de spermatozoïdes ont eu un OR sensiblement plus haut pour montrer les niveaux élevés d'IFA comparés aux hommes avec une mobilité et une morphologie normale dans une étude faite par Erenpreiss *et al.* (2008).

Dans notre étude la différence non significative de la mobilité entre le groupe d'IFA $\leq 30\%$ et le groupe d'IFA $> 30\%$ peut être expliquée par l'amélioration de ce paramètre par la sélection des spermatozoïdes avec la technique de CGD.

Erenpreiss *et al.* (2008) ont fait une étude qui a ciblé la recherche de la prédominance des niveaux élevés des dommages d'ADN spermatique parmi 350 hommes appartenant aux couples stériles avec des paramètres spermatiques standard normaux et anormaux. 16% des hommes avec des paramètres anormaux, et 5% des hommes avec des paramètres normaux, ont montré un IFA $> 30\%$, l'auteur en a supposé que l'évaluation des dommages d'ADN spermatique est importante pour choisir la méthode de PMA la plus appropriée. Cependant les données de haute qualité de l'ADN spermatique mesurée par le test de SCSA ne sont pas directement prédictives du bon potentiel de fertilité, puisque la fertilité normale exige beaucoup d'autres traits positifs tels que la mobilité, la morphologie et l'intégrité d'acrosome (Evenson *et al.*, 1999). Saleh *et al.* (2002) ont trouvé qu'un IFA $> 24\%$ est trouvé chez les patients stériles avec une normozoospermie. Les dommages accrus d'ADN peuvent être, au moins en partie, responsables de la faible fertilité chez les hommes qui ont par ailleurs des paramètres spermatiques standard normaux à partir des analyses répétées et, en conséquence, sont diagnostiqués comme ayant une stérilité non expliquée ou idiopathique (Saleh *et al.*, 2002). Le seuil de 30%, utilisé dans notre étude n'a pas montré une telle situation, c-à-d présence de paramètres standard normaux et une fragmentation d'ADN spermatique élevée.

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). Si nous supposons que les dommages d'ADN dans un patient particulier résultent seulement du manque de réparation des cassures d'ADN produites pendant la spermatogenèse, on pourrait logiquement attendre qu'il se corrèle également bien avec d'autres indices d'échec spermatogénique, comme l'oligozoospermie et la tératozoospermie (Erenpreiss *et al.*, 2006). Autrement dit, si les dommages d'ADN se font dans les testicules, foyer de spermatogenèse, les différents aspects de formation des spermatozoïdes seront affectés par la fragmentation d'ADN, ayant comme conséquence par exemple l'altération de la morphologie au cours de la spermiogenèse. On peut supposer aussi comme hypothèse que le taux élevé de fragmentation d'ADN conduit à l'élimination des spermatozoïdes altérés par l'apoptose avec un échappement de certains nombres, ce qui explique la corrélation négative entre l'IFA et la numération. Oosterhuis *et al.* (2000) ont trouvé une corrélation négative entre le pourcentage des spermatozoïdes possédant un marqueur apoptotique (l'annexin V) et la concentration et la mobilité de spermatozoïdes. Il faut noter que le stress oxydant (ROS) endommage les membranes des cellules et empêche la mobilité de spermatozoïdes, et cette même activité des ROS causent probablement la fragmentation d'ADN spermatique (Erenpreiss *et al.*, 2006 ; Wyrobek *et al.*, 2006).

D'autre part, les spermatozoïdes marqués pour la dégradation apoptotique peuvent avoir leur activité mitochondriale aussi bien que la mobilité et la morphologie normales (Evenson *et al.*, 2002). Les spermatozoïdes a marqueur apoptotique (TUNEL-positifs ou coloration d'annexin V) ont été trouvés dans des fractions de sperme avec une mobilité faible et élevée (Barroso *et al.*, 2000), et peuvent être trouvés dans les spermatozoïdes avec une morphologie normale (Host *et al.*, 2000a,b). Par conséquent, les spermatozoïdes apoptotiques peuvent avoir une morphologie et une mobilité normales, laissant le potentiel reproducteur défini par le taux d'activité des endonucléases et de la dégradation résultante d'ADN (Evenson *et al.*, 2002).

Enfin, l'absence de corrélation entre le volume du sperme et l'IFA peut être expliquée par le fait que le sperme est composé principalement par le liquide séminal issu de sécrétion des glandes annexes, en quelque sorte le volume séminale est indépendant de IFA touchant les spermatozoïdes.

7. Etude de la valeur prédictive de l'IFA

7.1. IFA et Fécondation des ovocytes

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'IFA est la formation des embryons matures par la microinjection des spermatozoïdes.

De plus, la comparaison entre les moyennes de fécondation des ovocytes ne montre pas de différence significative, pour les deux groupes IFA $\leq 30\%$ et IFA $> 30\%$ respectivement.

L'absence de lien entre la fécondation (fertilisation) des ovocytes au terme de formation des deux pronoyaux et l'IFA est confirmée par des études antérieures (Qiu *et al.*, 1995 ; Sakkas *et al.*, 1996, 1998; Aitken *et al.*, 1998 ; Lopes *et al.*, 1998 b; Twigg *et al.*, 1998b; Host *et al.*, 2000a,b ; Evenson *et al.*, 2002 ; Morris *et al.*, 2002a; Bungum *et al.*, 2004; Gandini *et al.*, 2004, 2007 ; Guérin *et al.*, 2005; Zini *et al.*, 2005; Nicopoullos *et al.*, 2008) .

A l'échelle expérimental, même si des dommages oxydatifs extrêmement élevés de l'ADN sont induits dans les populations de spermatozoïdes humains par co-incubation avec des leucocytes activés, exposition au peroxyde d'hydrogène ou stimulation excessive du système de génération des radicaux libres par les spermatozoïdes eux-mêmes avec le NADPH, une fécondation réussie peut encore être réalisée avec ICSI (Twigg *et al.*, 1998b,c). Bien que l'exposition aux conditions d'oxydation puisse induire des cassures de l'ADN, la création de liaisons entre l'ADN et les protéines, et des modifications de bases, le niveau des fragmentation de l'ADN défini par Nick translation (NT) n'est pas lié à la fécondation (Evenson *et al.*, 2002).

Une étude réalisée par Sadeghi *et al.* (2011) a ciblé la comparaison des taux de fragmentation de l'ADN spermatique mesurés par Chromomycin A3 (CMA3), le Bleu d'Aniline (BA) et le Bleu de Toluidine (BT). L'effet de cette fragmentation sur les résultats d'ICSI (par sperme éjaculé et ou prélevé de l'épididyme) ne révélait aucune corrélation significative entre la condensation de la chromatine (résultats de CMA3 et AB) et la fragmentation d'ADN (BT) avec le taux de fertilisation. Les résultats de l'étude réalisée par Larson-Cook *et al.* (2003) indiquent que le taux de fécondation ($72,5\% \pm 0,2\%$) n'est pas lié à l'IFA, à l'IFA modéré ou élevé, ou bien à l'HDS.

Ce manque de lien entre la fécondation des ovocytes injectés et le taux de FAS peut être expliqué par plusieurs facteurs. Le choix de spermatozoïdes qui seront injectés se fait généralement selon leur morphologie et leur mobilité, et comme nous l'avons déjà mentionné, plusieurs études ont montré qu'il existe une corrélation entre la morphologie et la mobilité d'une part et la FAS d'autre part, cela veut dire que les spermatozoïdes injectés porteraient peut être moins d'endommagements au niveau de leur ADN. Cela est conforme avec l'hypothèse proposée par Avendaño *et al.* (2010). Sakkas *et al.* (1998) propose aussi dans son étude que les spermatozoïdes choisis pour l'ICSI feraient partie de ceux qui ne possèdent pas d'anomalies dans le noyau spermatique.

L'absence de corrélation entre l'ADN fragmenté et la fécondation 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 de 4 cellules et le stade de 8 cellules (Tesarik *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 troisième jour environ après la fécondation (Hazout *et al.*, 2008).

D'autres parts, en plus des altérations de l'ADN, les radicaux libres altèrent aussi la membrane plasmique des spermatozoïdes, ces derniers ne peuvent pas participer au processus normal de fécondation (Aitken *et al.*, 2001), mais l'internalisation de spermatozoïde dans l'ovocyte dans la procédure d'ICSI dépasse ce problème et la fécondation peut avoir lieu normalement.

Cependant, ne il faut pas oublier de citer aussi certaines études qui soulèvent l'impact négative de la FAS sur la formation des deux pronoyaux après microinjection (Host *et al.*, 2000b; Tesarik *et al.*, 2002 ; Seli *et al.*, 2005; Muriel *et al.*, 2006; Avendaño *et al.*, 2010). Lopes *et al.* (1998b) ont prouvé que les hommes avec une population contenant plus de 25% de spermatozoïdes ayant des dommages d'ADN ont une chance inférieure à 20% d'avoir une fécondation réussie après ICSI. Ceci pourrait s'expliquer par un mauvais empaquetage de l'ADN et/ou sa fragmentation qui contribuerait à l'échec de décondensation de la chromatine des spermatozoïdes après ICSI et qui conduirait ainsi à l'échec dans la fertilisation, comme il a été proposé par Sakkas *et al.* (1996, 1998).

7.2. IFA et Qualité des embryons

Notre étude montre une absence de corrélation entre la qualité (a+b) des embryons (embryons qui seront transférés) et la fragmentation de l'ADN spermatique.

Cependant, la comparaison des deux catégories de patients (IFA \leq 30% et IFA $>$ 30%) montre qu'il existe une différence significative entre eux par rapport à la moyenne des embryons de qualité a+b.

La comparaison entre la moyenne des embryons de la qualité (a+b) et celle des embryons de qualité c au sein de chaque groupe de patients a montré une différence significative entre ces deux moyennes, que ce soit dans le groupe IFA \leq 30% ou bien dans le groupe IFA $>$ 30%.

Le résultat qui attire le plus d'attention est le fait que les embryons de bonne qualité (qualité a et qualité b) soient beaucoup plus fréquents chez les patients avec un IFA $>$ 30%.

Une multitude d'études préalables ont marqués l'absence de liaison entre l'IFA mesuré par différentes méthodes et la qualité des embryons issus d'ICSI selon différentes classifications (Lopes *et al.*, 1998b; Shoukir *et al.*, 1998 ; Benchaib *et al.*, 2003; Larson-Cook *et al.*, 2003; Tesarik *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Bungum *et al.*, 2007; Sadeghi *et al.*, 2011). De plus, selon Evenson *et al.* (2002) l'amélioration de la structure de la chromatine spermatique dans les procédures de PMA n'a pas été associée aux améliorations des taux de fécondation et de qualité des embryons.

L'absence de corrélation entre l'IFA et la qualité des embryons peut être partiellement expliquée par le fait que les spermatozoïdes de la meilleure qualité ont été choisis dans le procédé d'ICSI (Sadeghi *et al.*, 2011). Dans la procédure de microinjection le choix des spermatozoïdes se fait principalement selon leur morphologie.

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). Avendaño *et al.* (2010) ont montré que la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes morphologiquement normaux affecte négativement la qualité des embryons dans les cycles d'ICSI. Notre étude montre en effet que l'ICSI favorise toujours l'obtention des embryons de bonne qualité (qualité a et qualité b) par rapport à la qualité c dont les embryons ne sont pas transférés. Cependant, c'est le fait que cette différence soit plus notable dans la catégorie des patients ayant un IFA > 30% qui semble en désaccord avec les résultats de Avendaño *et al.* (2010).

Plusieurs explications de ce résultat pourraient être données. Premièrement, il se pourrait qu'il soit dû au fait que la capacité de l'ADN spermatique à faire face à l'ampleur de ses dommages dépend de la qualité de l'ovocyte et de l'âge de la femme (Babazadeh *et al.*, 2010).

Deuxièmement, l'ADN spermatique fragmenté est considéré comme promutagène (Aitken *et al.*, 2001). Il n'altère pas la fécondation ou le clivage embryonnaire parce que le génome paternel est transcriptionnellement inactif jusqu'au deuxième jour après la fécondation (Agarwal *et al.*, 2004), bien qu'une intervention du génome spermatique dès le premier cycle de division ait été envisagée (Tesarik *et al.*, 2002).

Troisièmement, il faut signaler aussi que les ovocytes pourraient également contenir de l'ADN fragmenté ou endommagé, comme ce qui a été suggéré par des études chez les souris (Tesarik *et al.*, 1986) et chez l'humain (Lim *et al.*, 1997 ; Ahmadi *et al.*, 1999 ; Larson-Cook *et al.*, 2003).

7.3. IFA et Grossesse biochimique (GB)

Au point de vu du dosage de β hCG, la différence n'est pas significative entre les patientes appartenant au groupe d'IFA $\leq 30\%$ et ceux qui appartiennent au groupe d'IFA $>30\%$.

7.4. IFA et Grossesse clinique (GC)

Les résultats de l'échographie sont identiques aux résultats de grossesse biochimique.

7.5. IFA et Naissance et avortement

L'avortement est apparu au deuxième mois de la grossesse. La comparaison entre les deux catégories conclue que la différence n'est pas significative.

La comparaison entre les taux d'accouchement c-à-d grossesse arrivée à terme de 9 mois, ne révèle aucune différence significative entre les deux catégories des patients. On note que tous les nouveaux nés sont en bonne santé sauf un cas de mortalité natale avec des malformations congénitales issu d'un couple qui appartient à la catégorie d'IFA $\leq 30\%$ avec un IFA= 03,6%.

Notre étude a eu comme résultat l'absence de différence significative entre les deux catégories de patients 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 and Sigman, 2009; Babazadeh *et al.*, 2010). Hammadeh *et al.* (1996) ont démontré que ni la condensation de la chromatine (révélée par coloration au bleu d'aniline) ni la morphologie des spermatozoïdes pourraient évaluer le potentiel de fertilisation, le clivage embryonnaire ou le taux de grossesse dans l'ICSI.

La mesure du taux de FAS après la centrifugation par gradient de densité par SCSA a révélé l'absence de différence significative d'IFA entre ceux qui ont eu une grossesse clinique et ceux qui n'en ont pas eu (Bungum *et al.*, 2008). De plus, d'après une revue systématique et méta-analyse des études d'ICSI réalisée par Zini *et al.* (2009), les dommages de l'ADN spermatique ne sont pas associés aux taux de grossesse d'ICSI.

Il n'est pas, en fait, étonnant que le procédé d'ICSI, qui dépasse des interactions normales œuf-spermatozoïde, et qui a été initialement développé pour les hommes avec des paramètres spermatiques très gravement altérés (Palermo *et al.*, 1992), permet même aux spermatozoïdes de qualité très mauvaise d'initier une grossesse réussie (Erenpreiss *et al.*, 2006). L'absence d'un impacte de l'IFA sur la grossesse peut être due à la sélection des embryons de bonne qualité qui ont pu continuer leur développement normale. Les effets nuisibles de la fragmentation de l'ADN spermatique ont été exclus pendant le choix d'embryons (Huang *et al.*, 2005). Une autre possibilité explique ce manque de lien est que peut être le seuil de 30% est un peu surestimé puisque il prend aussi en considération les spermatozoïdes anormaux, écartés dans la procédure d'ICSI.

Au-dessus de 45 % d'IFA, Guérin *et al.* (2005) n'ont jamais eu de grossesses évolutives quelle que soit la technique de PMA proposée incluant l'ICSI. Un groupe d'auteurs ont montré l'association entre l'IFA et l'échec de conception après ICSI (Host *et al.*, 2000b ; Larson *et al.*, 2000, Larson-Cook *et al.*, 2003 ; Evenson *et al.*, 1999, Lopes *et al.*, 1998b). De plus, Les spermatozoïdes avec un ADN défectueux peuvent féconder un ovocyte, produisent des embryons de stade précoce de haute qualité, et puis, en vue du degré des dommages d'ADN, échouent à produire une grossesse (Ahmadi and Ng, 1999b). Larson *et al.* (2000) ont trouvé que les patients traités par l'ICSI n'ont pas de grossesse si plus de 27% des spermatozoïdes montraient la susceptibilité à la dénaturation de l'ADN déterminée par SCSA.

Quoique les études qui ciblent la détermination de la relation entre les taux de FAS et l'avortement soient peu nombreuses, nos résultats sont compatibles avec des études préalables comme celle de Bungum *et al.* (2007) lorsque la perte de grossesse précoce a été définie comme un avortement avant la douzième semaine gestationnelle avec un seuil de 30% de FAS. Cependant, on ne pourrait pas exclure le fait que des niveaux d'IFA > 60% soient associés à un plus gros risque de perte de grossesse précoce, une issue qui devrait être abordée dans des études complémentaires (Bungum *et al.*, 2007).

Selon d'autres études l'association entre le taux de FAS et l'avortement était mise en évidence (Ahmadi and Ng, 1999a,b; Virro *et al.*, 2004 ; Borini *et al.*, 2006 ; Zini *et al.*, 2008). Un test de SCSA a été réalisé sur 106 couples qui ont échoué à avoir une grossesse réussie en au moins de deux tentatives précédentes de FIV, les auteurs ont constaté que l'IFA \geq 30 % a été associé à faible taux de grossesse maintenue, particulièrement lié à un taux élevé de fausses couches après ICSI (Check *et al.*, 2005).

En fin, il faut savoir que ces controverses concernant la valeur prédictive de la FAS pourraient être expliquées par la capacité de réparation de l'ADN spermatique par l'ovocyte qui fait que même lorsque en utilise un test avec une valeur prédictive élevée, tel que le test TUNEL par cytométrie de flux, il donne une basse spécificité (Sakkas *et al.*, 2010). Ainsi, dans les couples chez qui le niveau de la fragmentation d'ADN spermatique est relativement élevé, la probabilité que des embryons normaux ou une grossesse viable soient produit va dépendre, au moins en partie, du nombre d'ovocytes de la métaphase II⁴ obtenus et de leur capacité de réparer des dommages d'ADN dans le spermatozoïde fécondant (Sakkas *et al.*, 2010).

⁴ Les ovocytes restent bloqués en stade de métaphase II, ils reprennent leur division après la fécondation.

8. Etude de l'effet de l'âge des femmes

8.1. Age des femmes et fécondation

Il n'existe pas de corrélation entre l'âge des femmes et le taux de fertilisation des embryons dans les deux groupes classés selon l'IFA.

8.2. Age des femmes et grossesse

La comparaison entre la moyenne d'âge des femmes selon que la GB soit positive ou négative n'indique pas une différence significative pour la catégorie d'IFA $\leq 30\%$, tout comme la catégorie d'IFA $> 30\%$.

L'absence de lien entre l'âge de la femme et la fécondation des ovocytes ou la grossesse revient peut être à l'âge moyen jeune des patientes, leur amplitude est de [23 – 37] ans chez les couples d'IFA $\leq 30\%$ et [24 – 40] ans chez les couples d'IFA $> 30\%$.

Pendant longtemps l'âge de la femme été considéré comme le seul facteur de valeur pronostique significative pour les résultats de la PMA (Hull *et al.*, 1996). Dans l'étude réalisée par Avendaño *et al.* (2010) il n'y avait aucune différence statistiquement significative dans l'âge de femmes en comparant le groupe des femmes enceintes au groupe des femmes qui ne le sont pas, mais l'analyse de régression multiple, indique que l'IFA normal, l'âge de la femme, et le nombre d'ovocytes fécondés étaient les causes déterminantes principales de la qualité de l'embryon.

L'ovocyte et l'embryon précoce ont la capacité de réparer les endommagements dans l'ADN de spermatozoïde fécondant (Brandriff and Pedersen, 1981; Matsuda and Tobari, 1988; Genesca *et al.*, 1992; Ahmadi and Ng, 1999b; Marchetti *et al.*, 2007; Derijck *et al.*, 2008). Cependant, les ovocytes dont les mécanismes de réparation d'ADN ne sont pas fonctionnels ou qui sont endommagés par des facteurs endogènes (par exemple, les radicaux libres) ou exogènes (par exemple, le rayonnement, les toxiques environnementaux) ne pourraient pas réparer ces dommages (Sakkas *et al.*, 2010).

Le mécanisme de réparation ovocytaire n'est pas élucidé complètement, mais on sait par exemple, que l'œstradiol augmente les capacités réparatrices des polymérase qui interviennent après la réparation (Murdoch and Van Kirk, 2002). Il existe aussi des systèmes d'excision dans l'ovocyte (Menezo *et al.*, 2006). La GH (hormone de croissance) est probablement un effecteur dans les phénomènes de réparation de l'ADN (Menezo *et al.*, 2006) et on sait que son récepteur est présent dans l'ovocyte et au cours du développement embryonnaire (Menezo *et al.*, 2003).

En fait, la réparation commence déjà dans la phase pré-S zygotique (Derijck *et al.*, 2008). La réparation ensuite à lieu, dans la phase S⁵ zygotique par un certain nombre de protéines de réparation parmi lesquelles la RAD51 (Derijck *et al.*, 2008). Cette chronologie de réparation explique en partie l'indépendance de l'IFA de la formation des pronoyaux et la qualité embryonnaire observée dans notre étude et d'autres études.

Cependant, le pouvoir des ovocytes injectés par des spermatozoïdes contenant un ADN fragmenté de réparer ces endommagements est lié à la qualité ou le type de cette fragmentation. Des études ont montré que la fragmentation d'ADN simple brin est plus facile à réparer que la fragmentation double brin (Phillips and Baltz, 1996 ; Ahmadi and Ng, 1999b; Phillips *et al.*, 2000), bien qu'il existe des preuves que les polymérase puissent également réparer les dommages bi-caténaire de l'ADN (Garcia-Diaz *et al.*, 2000).

⁵ La phase S est la phase de répllication d'ADN pendant la division cellulaire.

D'autre part la réparation dépend aussi du taux de FAS présente dans le spermatozoïde injecté, ce qui est inconnu. Si des spermatozoïdes sont choisis à partir des échantillons avec de l'ADN intensivement endommagée et employés pour la fertilisation *in vitro*, les capacités de réparation de l'ovocyte peuvent être insatisfaisantes, menant à un faible taux du développement embryonnaire et un taux élevé de perte précoce de grossesse (Ahmadi and Ng, 1999b, Meseguer *et al.*, 2011). Par exemple, les chercheurs ont conclu que l'ovocyte a la capacité de réparer des dommages d'ADN spermatique quand il est endommagé de moins de 8% (Sakkas *et al.*, 2010). Même pour la fragmentation d'ADN simple brin, si un spermatozoïde fécondant possède des coupures d'ADN de ce genre de taille significative, ceux-ci peuvent poser une difficulté pour que l'ovocyte les répare et peuvent mener à l'échec dans le procédé de fécondation ou plus tard dans le développement (Sakkas *et al.*, 1999).

Il existe donc une combinaison entre l'effet paternel (intégrité de génome) et maternel (qualité ovocytaire et pouvoir de réparation) qui influe sur les résultats d'ICSI. La capacité de l'ovocyte à lancer la réparation, en grande partie, va dépendre de la qualité cytoplasmique et génomique de l'ovocyte, qui est affecté nettement par l'augmentation de l'âge (Sakkas *et al.*, 2010). Ce qui est confirmée dans cette étude par l'absence de lien entre l'âge de femmes qui été relativement jeune et les résultats d'ICSI par rapport à l'IFA. L'âge de la femme est donc un facteur très important qui détermine la capacité de l'ovocyte à réparer la FAS (Evenson *et al.*, 2002; Meseguer *et al.*, 2011). Cette capacité de réparation ovocytaire est limitée et peut varier d'un ovocyte à un autre et même entre différentes cohortes des ovocytes de la même patiente ou de différentes patientes (Sakkas *et al.*, 2010).

Conclusions et Perspectives

Cette étude a focalisé la lumière sur plusieurs volets concernant l'impacte de la fragmentation de l'ADN spermatique (FAS) sur les paramètres de la reproduction *in vitro*, plus précisément l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI).

Nous avons étudié le taux de FAS par un test de dispersion de la chromatine spermatique ou SCD et représenté ce taux sous forme d'un index de FAS (IFA). Ce test est, en effet, facile et sensible et pourra être recommandé au niveau des laboratoires des centres de fertilité. Une étude réalisée par Zhang *et al.* (2010) a montré que les tests TUNEL et SCD sont deux tests efficaces pour la détection de la FAS, mais en utilisant le microscope photonique à fond clair (comme celui utilisé dans notre étude) le test de SCD paraît être plus sensible par rapport au test TUNEL.

Dans notre travail, nous avons essayé d'étudier l'IFA, en prenant en considération, un par un, d'abord des paramètres généraux: âge des hommes, antécédents de recours à une technique de PMA, tabagisme et caractéristiques standard du sperme (numération et mobilité des spermatozoïdes). Nous n'avons trouvé aucun lien entre l'IFA et ces paramètres, mises à part la numération et la mobilité des spermatozoïdes qui étaient inversement corrélés à l'IFA. Par la suite, la valeur prédictive de notre test a été évaluée par rapport à: la fécondation des ovocytes, la qualité des embryons obtenus, la survenue de grossesse biochimique ou clinique et celle d'avortement ou de naissance. L'étude de l'influence de l'âge de la femme a été réalisée également. Le résultat le plus important est que la FAS mesurée par le test SCD n'a pas de valeur prédictive pour le succès de l'ICSI. De ce fait, on pourra dire que l'ICSI peut être une technique performante et efficace chez les patients avec des niveaux élevés de cassures de l'ADN spermatique. Elle est déjà un traitement des altérations des paramètres standard du sperme, eux même négativement corrélés avec l'IFA, comme nous l'avons démontré. On prétend même que les mesures de l'intégrité d'ADN spermatique sont plus objectives et reproductibles que celles des paramètres conventionnels spermatiques (Evenson *et al.*, 1991).

Par ailleurs, des études préalables ont tenté de faire une comparaison entre la technique de la FIV et l'ICSI, ce qui était impossible dans notre étude à cause du faible nombre de candidats pour la FIV classique. Plusieurs études ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les résultats de la FIV et l'ICSI, mais ceux d'ICSI sont mieux que ceux de la FIV du point de vue grossesse clinique, grossesse biochimique et naissance (Bungum *et al.*, 2007, 2008), ces deux dernières études ont utilisé le test de SCSA pour un seuil de 30%. Bungum *et al.* (2004) ont trouvé le même résultat par SCSA avec un seuil de 27% et ont confirmé à leur tour les résultats de Host *et al.* (2000b) en utilisant le test TUNEL. Ces résultats ne vont pas à l'encontre des

nôtres puisque nous avons observé que l'ICSI peut conduire à une grossesse jusqu'à l'accouchement malgré un IFA élevé (> 30%).

Le rendement plus élevé d'ICSI, même avec des niveaux élevés d'IFA, par rapport à la FIV pourrait être dû aux deux milieux de culture différents qui sont utilisés pour ces deux techniques (Bungum *et al.*, 2007). De plus, les ovocytes de la FIV sont exposés aux spermatozoïdes pour 90 minutes, alors que dans l'ICSI les spermatozoïdes sont injectés directement dans l'ovocyte (Bungum *et al.*, 2007). Dans l'ICSI, l'ovocyte pourrait donc être moins exposé aux espèces réactives oxygénées (ROS) que dans la FIV (Bungum *et al.*, 2007), et comme nous avons déjà mentionné, la sélection artificielle de spermatozoïdes pendant le procédé d'ICSI pourrait avoir aidé à la neutralisation de l'effet négatif dans une certaine mesure (Huang *et al.*, 2005).

En général, dans cette dernière décennie un nombre très important de travaux ont été publiés dans le domaine de la PMA et sa relation avec la FAS, cependant différents résultats ont été trouvés, ce qui complique la précision de la valeur prédictive de FAS sur le succès de la PMA notamment l'ICSI. Ces différences sont dû à plusieurs facteurs, parmi lesquels la nature du sperme testé, frais ou après traitement (par la CGD: centrifugation par gradient de densité, par exemple); car on sait que le traitement du sperme peut améliorer la qualité et l'intégrité de l'ADN (Bungum *et al.*, 2008) ce qui augmente la probabilité d'injecter l'ovocyte par un spermatozoïde avec un ADN intact. Un autre facteur pouvant influencer les résultats est la taille de l'échantillon. Dans notre cas le nombre de patients inclus était dépendant de la quantité de réactif de SCD disponible. Et enfin, comme nous l'avons déjà dit, le résultat d'ICSI fait appelle aussi aux facteurs féminins. Les différentes études ont touché différents éventails d'âge des conjointes, ce qui a fait que la qualité des ovocytes soit différente d'une étude à une autre.

L'ADN spermatique le plus endommagé est généralement trouvé chez les hommes dont le sperme est de qualité la plus mauvaise, les spermatozoïdes étant incapables d'une fécondation (Irvine *et al.*, 2000). Ceci pourrait être considéré comme un mécanisme de protection qui assure que les spermatozoïdes le plus sévèrement atteints ne transmettent pas leur ADN endommagé à l'embryon (Aitken and Krausz, 2001). Cependant, cette protection est éliminée quand l'ICSI est employée (Aitken and Krausz, 2001). La sécurité du procédé d'ICSI a été ainsi remise en cause (Schultz and Williams, 2002). Aitken and Krausz (2001) pensent que les dommages d'ADN de spermatozoïdes sont promutagéniques et peuvent provoquer des mutations après fécondation, puisque l'ovocyte essaye de réparer les dommages d'ADN avant le déclenchement du premier clivage. Des mutations se produisant en ce moment seront fixées dans la lignée germinale et pourront être responsables de l'induction de pathologies, comme des cancers chez les enfants (Fraga *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 1997; Aitken and Krausz, 2001) et certaines maladies congénitales

graves (Cox *et al.*, 2002 ; De Baun *et al.*, 2003). Quelques études indiquent une augmentation des anomalies des chromosomes sexuels (Bonduelle *et al.*, 1996; Meschede and Horst, 1997) et des délétions irréparables sur le long bras du chromosome Y chez ces enfants (Aitken and Krausz, 2001).

Des méthodes de sélection des spermatozoïdes avec un ADN intacte devraient donc être développées afin d'éviter le risque potentiel d'employer des gamètes avec des cassures de chromatine pour le traitement d'ICSI (Bungum *et al.*, 2004). Ceci exige des expérimentations sur des modèles animaux et des précisions sur les régions de l'ADN qui sont affectées par ces cassures ainsi que la combinaison entre les pouvoirs réparateurs ovocytaires et la FAS.

Notre étude, est à notre connaissance, la première du genre qui a été réalisée en Algérie. Elle a permis d'évaluer, pour la première fois, l'importance de la FAS chez un petit échantillon de patients algérien candidats à l'ICSI. L'élargissement de cet échantillon permettrait certainement d'avoir plus d'informations sur l'importance des anomalies de l'intégrité génomique des spermatozoïdes dans les techniques de PMA en Algérie.

Références bibliographiques

- Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Fahmy I, Kamal A, Tawab NA and Amin YM** (1997) Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm *Fertility and Sterility* **68** 108–111
- Agarwal A and Allamaneni SS** (2004) The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review *Minerva Ginecologica* **56** 235-245
- Ahmadi A and Ng SC** (1999a) Developmental capacity of damaged spermatozoa *Human Reproduction* **14** 2279-2285
- Ahmadi A and Ng SC** (1999b) Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa *The journal of experimental zoology* **284** 696–704
- Aitken RJ and Clarkson JS** (1988) Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques *Journal of Andrology* **9** 367–376
- 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
- Apedaile AE, Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Johnston SA and Baker HW** (2004) Flow cytometry and microscopic acridine orange test: relationship with standard semen analysis *Reproductive Biomedicine Online* **8** 398-407
- Avendaño C, Franchi A, Duran H and Oehninger S** (2010) DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome *Fertility and Sterility* **94** 549–557
- Babazadeh Z, Razavi S, Tavalae M, Deemeh MR, Shahidi M and Nasr-Esfahani MH** (2010) Sperm DNA damage and its relation with leukocyte DNA damage *Reproductive Toxicology* **29** 120–124
- Balhorn IL** (1982) A model for the structure of chromatin in mammalian sperm *Journal of Cell Biology* **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—a position report *Human Reproduction* **25** 824–838

- Barroso G, Morshedi M and Oehninger S** (2000) Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa *Human Reproduction* **15** 1338–1344
- Benchai M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H and Gueârin JF** (2003) Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique *Human Reproduction* **18** 1023-1028
- 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
- Bonde JP** (2010) Male reproductive organs are at risk from environmental hazards *Asian Journal of Andrology* **12** 152-156
- Bonduelle M, Legein J, Buysse A, Van Assche E, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC and Liebaers I** (1996) Prospective follow-up study of 432 children born after ICSI *Human Reproduction* **11** 1558-1564
- Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C and Coticchio G** (2006) Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART *Human Reproduction* **21** 2876–2881
- Brahem S, Mehdi M, Landolsi H, Mougou S, Elghezal H, and Saad A** (2011) Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss *Urology* **78** 792–796
- Brandriff B and Pedersen RA** (1981) Repair of the ultraviolet irradiated male genome in fertilized mouse eggs *Science* **211** 1431–1433
- Braude P, Bolton V and Moore S** (1988) Human gene expression first occurs between the four and eight-cell stages of preimplantation development *Nature* **332** 459-461
- Brewer LR, Corzett M and Balhorn R** (1999) Protamine induced condensation and decondensation of the same DNA molecule *Science* **286** 120–123
- Brinkworth MH** (2000) Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans *International Journal of Andrology* **23** 123–135
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L and Giwercman A** (2004) The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI *Human Reproduction* **19** 1401–1408

- Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J and Giwercman A** (2007) Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome *Human Reproduction* **22** 174–179
- Bungum M, Spanò M, Humaidan P, Eleuteri P, Rescia M and Giwercman A** (2008) Sperm chromatin structure assay parameters measured after density gradient centrifugation are not predictive for the outcome of ART *Human Reproduction* **23** 4–10
- Check JH, Graziano V, Cohen R, Krotec J and Check ML** (2005) Effect of an abnormal sperm chromatin structural assay (SCSA) on pregnancy outcome following (IVF) with ICSI in previous IVF failures *Archives of Andrology* **51** 121–124
- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ and Carrell DT** (2006) Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm *Journal of Andrology* **27** 53-59
- Cohen J** (1992) Zona pellucida micromanipulation and consequences for embryonic development and implantation, in *Micromanipulation of Human Gametes and Embryos* Raven Press, New York, NY
- Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménézo YJ, Clement P, Hamidi J and Benkhalifa M** (2009) Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients *Fertility and Sterility* **91** 1801-1805
- Collins JA, Barnhart KT and Schlegel PN** (2008) Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertility and Sterility* **89** 823–831
- Corzett M, Mazrimas J and Balhorn R** (2002) Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals *Molecular Reproduction and Development* **61** 519–527
- Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL and Horsthemke B** (2002) Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects *American Journal of Human Genetics* **71** 162-164
- Crow JF** (1993) The high spontaneous mutation rate: is it a health risk? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94** 8380-8386
- Daya S, Gwatkin RBL and Bissessar H** (1987) Separation of motile human spermatozoa by means of a glass bead column *Gamete Research* **17** 375–380
- De Baun MR, Niemitz EL and Feinber AP** (2003) Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19 *American Journal of Human Genetics* **72** 156-160

- De Geyter Ch, Bals-Pratsch M, Dören M, Yeung CH, Grunert JH, Bordt J, Schneider HPG and Nieschlag E** (1988) Human and bovine cervical mucus penetration as a test of sperm function for in-vitro fertilization *Human Reproduction* **3** 948–954
- Deligdish L and Lowenthal M** (1970) Endometrial changes associated with myomata of the uterus *Journal of Clinical Pathology* **23** 676–680
- Delvenne C, Université de liège Bibliothèque de la faculté de médecine.** Définition des principaux types d'études [En line] 2002 [www.ebm.lib.ulg.ac.be/Définition des principaux types d'études.htm](http://www.ebm.lib.ulg.ac.be/Définition%20des%20principaux%20types%20d'études.htm)
- Derijck A, van der Heijden G, Giele M, Philippens M and De Boer P** (2008) DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation *Human Molecular Genetics* **17** 1922–1937
- Devreker F, Emiliani, S, Revelard P, Van den Bergh M, Govaerts I and Englert Y** (1999) Comparison of two elective transfer policies of two embryos to reduce multiple pregnancies without impairing pregnancy rates *Human Reproduction* **14** 83–89
- Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Pölz W and Tews G** (2001) Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome *Fertility and Sterility* **76** 281–285
- Englert Y, Van den Bergh M, Rodesch C, Bertrand E, Biramane J and Legreve A** (1992) Comparative auto-controlled study between swim-up and Percoll preparation of fresh semen samples for in-vitro fertilization *Human Reproduction* **7** 399–402
- Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M and Giwercman A** (2006) Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects *Asian Journal of Andrology* **8** 11–29
- Erenpreiss J, Elzanaty S and Giwercman A** (2008) Sperm DNA damage in men from infertile couples *Asian Journal of Andrology* **10** 786–790
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR** (1980a) Relation of mammalian sperm chromatin 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, Jost LK, Baer RK, Turner TW and Schrader SM** (1991) Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay *Reproductive Toxicology* **5** 115–125

- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, De Angelis P and Claussen OP** (1999) Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic *Human Reproduction* **14** 1039–1049
- 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
- Foresta C, Moro E and Ferlin A** (2001) Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis *Endocrine Reviews* **22** 226–239
- Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM and Ames BN** (1996) Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA *Mutation Research* **351** 199-203
- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A and Spanò M** (2004) Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage *Human Reproduction* **19** 1409–1417
- Garcia-Diaz M, Dominguez O, Lopez- Fernandez LA, de Lera LT, Saniger ML, Ruiz JF, Párraga M, García-Ortiz MJ, Kirchhoff T, Del Mazo J, Bernad A and Blanco L** (2000) DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis *Journal of Molecular Biology* **301** 851–867
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM and Schmid CW** (1987) Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin *Science* **236** 962–964
- Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, Germa JR and Egozcue J** (1992) Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg *Human Genetics* **89** 181–186
- Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury M and Zalensky AO** (2000) Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment *Journal of Cell Biology* **151** 1591–1598
- Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, and Roulier R** (1995) Embryo score to predict implantation after *in vitro* fertilization: based on 957 single embryo transfers *Human Reproduction* **10** 2427–2431
- Giwerzman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ and Rylander L** (2010) Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study *International Journal of Andrology* **33** 221–227

- Godwin I** (2004) *Cambridge guide to infertility management and assisted reproduction*. Cambridge University Press, UK
- Goldberg RB, Geremia R and Bruce WR** (1977) Histone synthesis and replacement during spermatogenesis in the mouse *Differentiation* **7** 167–180
- Gorczyca W, Gong J and Darzynkiewicz Z** (1993b) Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays *Cancer Research* **53** 1945–1951
- Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H and Darzynkiewicz Z** (1993a) 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
- Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C and Tesarik J** (2005) Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa *Human Reproduction* **20** 226–230
- Griveau JF and Le Lannou D** (1997) Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology *International Journal of Andrology* **20** 61–69
- Guérin P, Matillon C, Bleau G, Lévy R, and Ménézio Y** (2005) Impact of sperm DNA fragmentation on ART outcome *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* **33** 665–668
- Hammadeh ME, al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Kupker D, Diedrich K and Schmidt W** (1996) The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection program *Human Reproduction* **11** 2468–2471
- 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
- Host E, Lindenberg S and Smidt-Jensen S** (2000a) DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization *in vitro* in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* **79** 189–193

- Host E, Lindenberg S and Smidt-Jensen S** (2000b) The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* **79** 599-563
- Huang CC, Lin DPC, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, and Lee MS** (2005) Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates *Fertility and Sterility* **84** 130-140
- 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
- Hull MG, Fleming CF, Hughes AO and McDermott A** (1996) The age-related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization *Fertility and Sterility* **65** 783-790
- Iosif CS and Akerland M** (1983) Fibromyomas and uterine activity *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* **62** 165-167
- 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
- Jeyendran RS** (2003) *Sperm collection and processing methods: A practical guide* Cambridge University Press
- Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Ying DM and Jin F** (1997) Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of non-smoking mothers *Journal of the National Cancer Institute* **89** 238-224
- Kandeel FR and Swerdloff RS** (1988) Role of temperature in regulation of spermatogenesis and the use of heating as a method for contraception *Fertility and Sterility* **49** 1-23
- Katayama KP, Stehlik E and Jeyendran RS** (1989) In vitro fertilization outcome: glass wool-filtered sperm versus swim-up *Fertility and Sterility* **52** 670-672
- Keel, BA, May JV and De Jonge CJ** (2000) *Handbook of the assisted reproduction Laboratory* CRC Press LLC, USA
- Kosower NS, Katayose H and Yanagimachi R** (1992) Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei *Journal of Andrology* **13** 342-348
- Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J and Debatin KM** (1994) Regulation of apoptosis in the immune system *Current Opinions in Immunology* **6** 279-289
- Kubic CJ** (1986) Luteal phase dysfunction following ovulation induction *Seminars in Reproductive Endocrinology* **4** 293

- 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
- Laberge RM and Boissonneault G** (2005) On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids *Biology of Reproduction* **73** 289–296
- Lachaud C, Tesarik J, Canadas ML and Mendoza C** (2004) Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa *Human Reproduction* **19** 607–610
- Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK and Evenson DP** (2000) Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques *Human Reproduction* **15** 1717–1722
- Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, and Evenson DP** (2003) Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay *Fertility and Sterility* **80** 895–902
- Lee J, Richburg JH, Younkin SC and Boekelheide K** (1997) The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis *Endocrinology* **138** 2081–2088
- Levallois MP and Lemaire V** (2003) *Larousse médical*. Larousse, Paris
- Lim AS and Tsakok MF** (1997) Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes? *Fertility and Sterility* **68** 265–271
- Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ and Hwu YM** (2008) Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates *Fertility and Sterility* **90** 352–359
- Loft S, Kold-Jensen T, Hjollund NH, Giwercman A, Gyllemborg J, Ernst E, Olsen J, Scheike T, Poulsen HE and Bonde JP** (2003) Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy *Human Reproduction* **18** 1265–1272
- Long M, Stronati A, Bizzaro D, Kruger T, Manicardi GC, Hjelmberg PS, Spano M, Giwercman A, Toft G, Bonde JP and Bonfeld-Jorgensen EC** (2007) Relation between serum xenobiotic-induced receptor activities and sperm DNA damage and sperm apoptotic markers in European and Inuit populations *Reproduction* **133** 517–530
- Lopata A, Patullo MJ, Chang A and James B** (1976) A method for collecting motile spermatozoa from human semen *Fertility and Sterility* **27** 677–684
- Lopes S, Sun J, Jurisicova A, Meriano J and Casper RF** (1998b) Semen deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection *Fertility and Sterility* **69** 528–532

- 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 its relationship to chromomycin A3 accessibility *Biology of Reproduction* **52** 864–867
- Marchetti F, Essers J, Kanaar R and Wyrobek AJ** (2007) Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104** 17725-17729
- Marcon L and Boissonneault G** (2004) Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling *Biology of Reproduction* **70** 910–918
- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S and Stevens GA** (2012) National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys *PLoS Medicine* **9** 1001356
- Matson PL, Browne J, Deakin, R and Bellinge B** (1999) The transfer of two embryos instead of three to reduce the risk of multiple pregnancy: a retrospective analysis *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **16** 1–5
- Matsuda Y and Tobar I** (1988) Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized in vitro with sperm exposed to ultraviolet light and methyl and ethyl methansulfonate *Mutation Research* **198** 131–144
- McPherson SMG and Longo FJ** (1992) Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids *Molecular Reproduction and Development* **31** 268–279
- McPherson SMG and Longo FJ** (1993a) Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II *Developmental Biology* **158** 122–130
- McPherson SMG and Longo FJ** (1993b) Chromatin structure–function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids *European Journal of Histochemistry* **37** 109–128
- Menezo Y** (2006) Oocyte capacity to repair DNA damage induced in sperm *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* **35** Cahier 2 19-23
- Menezo YJ, El Mouatassim S, Chavrier M, Servy EJ and Nicolet B** (2003) Human oocytes and preimplantation embryos express mRNA for growth hormone receptor *Zygote* **11** 293-297
- Meschede D and Horst J** (1997) Sex chromosomal anomalies in pregnancies conceived through intracytoplasmic sperm injection: a case for genetic counseling *Human Reproduction* **12** 1125-1127

- Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohí J, and Fernandez JL** (2001) Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality *Fertility and Sterility* **95** 124–128
- Morris ID, Ilott S, Dixon L and Brison DR** (2002a) The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development *Human Reproduction* **17** 990–998
- Morris ID** (2002b) Sperm DNA damage and cancer treatment *International Journal of Andrology* **25** 255–261
- Moskovtsev SI, Willis J and Mullen JBM** (2006) Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility *Fertility and Sterility* **85** 496–499
- Moskovtsev SI, Willis J, White J and Mullen JBM** (2009) Sperm DNA Damage: Correlation to Severity of Semen Abnormalities *Urology* **74** 789–793
- Murdoch WJ and Van Kirk EA** (2002) Steroid hormonal regulation of proliferative, p53 tumor suppressor, and apoptotic responses of sheep ovarian surface epithelial cells *Molecular and Cellular Endocrinology* **186** 61–67
- Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, De Los Santos MJ and Meseguer M** (2006) Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection *Fertility and Sterility* **85** 371–383
- Nagy, Z., Liu, J., Joris, H Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P and Van Steirteghem AC** (1995) The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters *Human Reproduction* **10** 1123–1129
- Nicopoulos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Norman-Taylor JQ and Ramsay JW** (2008) Sperm DNA fragmentation in subfertile men: the effect on the outcome of intracytoplasmic sperm injection and correlation with sperm variables *BJU International* **101** 1553–1560
- Nieschlag E, Behre HM and Nieschlag S** (2010) *Andrology: Male reproductive health and dysfunction* 3rd Edn. Springer
- Oehninger S** (2000) Clinical and laboratory management of male infertility: an opinion on its current status *Journal of Andrology* **21** 814 – 821
- Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ Jr and Alvarez JG** (2001) Characterization of subsets of human spermatozoa

- at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility *Human Reproduction* **16** 1912–1921
- Oosterhuis GJE, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J and Vermes I** (2000) Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertility and Sterility* **74** 245–250
- 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
- Paulson JD and Polakoski KL** (1977) A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate *Fertility and Sterility* **28** 178–181
- Payne D, Flaherty SP, Jeffrey R, Warnes GM and Matthews CD** (1994) Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection *Human Reproduction* **9** 2051–2057
- Perreault SD** (2003) Distinguishing between fertilization failure and early pregnancy loss when identifying male-mediated adverse pregnancy outcomes *Advances in Experimental Medicine and Biology* **518** 189–198
- Perry MJ** (2008) Effects of environmental and occupational pesticide exposure on human sperm *Human Reproduction Update* **14** 233–242
- Phillips KP and Baltz JM** (1996) Intracellular pH change does not accompany egg activation in the mouse *Molecular Reproduction and Development* **45** 52–60
- Phillips KP, Leveille MC, Claman P and Baltz JM** (2000) Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos *Human Reproduction* **15** 896–904
- Poccia D** (1986) Remodelling of nucleoproteins during gametogenesis fertilization and early development *International Reviews in Cytology* **105** 1–65
- Post FA, Soule SG, Willcox PA and Levitt NS** (1994) The spectrum of endocrine dysfunction in active pulmonary tuberculosis *Clinical Endocrinology* **40** 367–371
- Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ and Jefferies TM** (1999) Sperm chromatin damage associated with male smoking *Mutation Research* **423** 103–111
- Qiu J, Hales BF and Robaire B** (1995) Damage to rat spermatozoal DNA after chronic cyclophosphamide exposure *Biology of Reproduction* **53** 1465–1473
- Reverso**, Dictionnaire français définition synonymes [En line] 2007
<http://dictionnaire.reverso.net/francais-definition>
- 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,p0-DDE and human sperm chromatin integrity *Environ Health Perspect* **113** 175–179

- Rizk B, Garcia-velasco J, Sallam H and Makrigrannakis A** (2008) *Infertility and assisted reproduction* Cambridge University Press
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I and Vassalli P** (1997) An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis *EMBO Journal* **16** 2262–2270
- Roti Roti JL and Wright WD** (1987) Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays for DNA damage and repair *Cytometry* **8** 461–467
- 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
- Sadeghi MR, Lakpour N, heidari-vala H, Hodjat M, Amirjannati N, Jadda HH, Binaafar S and 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
- 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* **4** 31–37
- Sakkas D, Seli E, Manicardi GC, Nijs M, Ombelet W and Bizzaro D** (2004) The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? *Human Fertility (Cambridge, England)* **7** 99–103
- Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ and Sharma RK** (2002) Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study *Fertility and Sterility* **78** 313– 318
- Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR and Thomas AJ** (2003) Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility *Fertility and Sterility* **79 Supplement 3** 1597– 1605
- Salgueiro E and Reyss A** (2002) *Biologie de la reproduction sexuée*. Belin
- Schultz RM and Williams CJ** (2002) The science of ART *Science* **296** 2188-2190
- Schulze-Osthoff K, Walczak H, Droge W and Krammer PH** (1994) Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis *Journal of Cell Biology* **127** 15–20
- Scott JR, Gibbs RS, Karlan BY and Haney AF** (2003) *Danforth's Obstetrics and Gynecology* 9th Edn. Lippincott Williams & Wilkins Publishers
- Seli E and Sakkas D** (2005) Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART *Human Reproduction Update* **11** 337–349
- Sergerie M, Bleau G, Teulé R, Daudin M and Bujan L** (2005) Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* **33** 89–101
- Settladge DSF, Motoshima M, and Tredway DR** (1972) Sperm transport from the external os to the fallopian tubes in women: a time and quantitation study *Fertility and Sterility* **24** 655–658

- Sharpe RM and Skakkebaek NE** (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* **341** 1392-1395
- Sharpe RM and Irvine DS** (2004) How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* **328** 447–451
- Shoukir Y, Chardonens D, Campana A and Sakkas D** (1998) Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Human Reproduction* **13** 1632–1637
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J Nagy Z, Tournaye H and Devroey P** (1995) High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy *Human Reproduction* **10** 148-152
- Singh NP, Muller CH and Berger RE** (2003) Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm *Fertility and Sterility* **80** 1420-1430
- 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
- Smit M, Dohle GR, Hop WCJ, Wildhagen MF, Weber RFA and Romijn JC** (2007) Clinical correlates of the biological variation of sperm DNA fragmentation in infertile men attending an andrology outpatient clinic *International Journal of Andrology* **30** 48–55
- Smith PJ and Sykes HR** (1992) Simultaneous measurement of cell cycle phase position and ionizing radiation induced DNA strand breakage in single human tumour cells using laser scanning confocal imaging *International Journal of Radiation Biology* **61** 553–560
- Soares SR and Melo MA** (2008) Cigarette smoking and reproductive function *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **20** 281-291
- Sotolongo B, Lino E and Ward WS** (2003) Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA *Biology of Reproduction* **69** 2029–2035
- Spano M, Kolstad AH, Larsen SB, Cordelli E, Leter G, Giwercman A and Bonde JP** (1998) The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies *Human Reproduction* **13** 2495–2505

- Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E and Leter G** (2000) Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish first pregnancy planner study team *Fertility and Sterility* **73** 43-50
- 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
- Stephenson MD** (1996) Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples *Fertility and Sterility* **66** 24–29
- 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
- Sun JG, Jurisicova A and Casper RF** (1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro *Biology of Reproduction* **56** 602–607
- 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
- Tesarik J, Kopečný V, Plachot M and Mandelbaum J** (1986) Activation of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and changes in the ribosomal content of human embryos developing in vitro *Journals of Reproduction and Fertility* **78** 463–470
- Tesarik J, Mendoza C and Greco E** (2002) Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI *Human Reproduction* **17** 184–189
- Tesarik J, Greco E and Mendoza C** (2004) Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation *Human Reproduction* **19** 611–615
- Thibault C and Levasseur MC** (2001) *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. INRA, Paris

- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M and Sakkas D** (2001) Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception *Human Reproduction* **16** 2160–2165
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJJ, Jégou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Müller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J and Skakkebaek NE** (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens *Environmental Health Perspectives* **104 Supplement 4** 741–803
- Tournaye H, Devroey P, Liu J, Lissens W and Van Steirteghem A** (1994) Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens *Fertility and Sterility* **61** 1045-1051
- Twigg JP, Irvine DS and Aitken RJ** (1998b) Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection *Human Reproduction* **13** 1864–1871
- Twigg JP, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L and Aitken RJ** (1998c) Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma *Molecular Human Reproduction* **4** 439–445
- 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, Tännerhoff 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

- Virant-Klun I, Tomazevic T and Meden-Vrtovec H** (2002) Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **19** 319–328
- Virro MR, Larson-Cook KL and Evenson DP** (2004) Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles *Fertility and Sterility* **81** 1289–1295
- Vollenhoven BJ, Lawrence AS, and Hely DL** (1990) Uterine fibroids: a clinical review *British Journal of Obstetrics and Gynecology* **97** 285–298
- Ward WS** (1997) Chromosome organization in mammalian sperm nuclei *Genetics of Human Male Fertility* 147-163
- Ward WS and COFFEY DS** (1991) DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells *Biology of reproduction* **44** 569-574
- World Health Organization** (1992) Recent advances in medically assisted conception. Report of a WHO Scientific Group *World Health Organization Technical Report Series* **820** 1-111
- World Health Organization** (1999) *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervival mucus interaction* 4th Edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS, and Evenson D** (2006) Advancing age in healthy men has differential effects on DNA strand damage, chromatin integrity, gene mutations, aneuploidies and diploidies in sperm *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103** 9601-9666
- 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
- Zalata A, Hafez T and Comhaire F** (1995) Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility *Human Reproduction* **10** 1444–1451
- Zhang L, Qiu Y, Wang K, Wang Q, Tao G and Wang L** (2010) Measurement of sperm DNA fragmentation using bright-field microscopy: comparison between sperm chromatin dispersion test and terminal uridine nickend labeling assay *Fertility and Sterility* **94** 1027–1032
- Zini A and Sigman M** (2009) Are tests of sperm DNA damage clinically useful? pros and cons *Journal of Andrology* **30** 219–229

- Zini A, Bielecki R, Phang D and Zenzes MT** (2001a) Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men *Fertility and Sterility* **75** 674–677
- Zini A, Kamal K, Phang D, Willis J and Jarvi K** (2001b) Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men *Urology* **58** 258–261
- Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA and Cadesky K** (2005) Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI *Human Reproduction* **20** 3476–3480
- Zini A, Boman J, Belzile E and Ciampi A** (2008) Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: Systematic review and meta-analysis *Human Reproduction* **23** 2663–2668
- Zoran JR and Saval M** (1999) *Stérilité du couple* Masson, Paris

Annexes

Annexe 1. Fiche technique de PureSperm® 100

PureSperm® 100

Application envisagée : résumé et explication

PureSperm®100 est une suspension de silice colloïdale stérile (autoclavage SAL-10⁻³) dans une solution saline isotonique. Elle est conçue pour la préparation de gradients de densité pour la séparation et la purification de sperme humain utilisé dans les techniques de reproduction assistée. Ce système assure une séparation efficace entre le sperme normal et les lymphocytes, les cellules épithéliales, le sperme immature ou anormal, les débris cellulaires, les bactéries et le liquide séminal.

Composants

Silice avec revêtement de silane	Ions sodium
Ions calcium	Eau de qualité WFI
Ions chlorure	HEPES
Ions potassium	EDTA
	Glucose

Caractéristiques

pH	7.4-7.8
Osmolalité (mOsm/kg H ₂ O)	300-310
Niveaux d'endotoxine	<1,0 EU/ml
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 MEA sur 2 cellules.

Conservation et stabilité

Conserver les flacons fermés entre 2 et 40 °C, et éviter les températures en-dehors de cette plage. Dans ces conditions, PureSperm®100 a une durée de conservation de 24 mois. La date d'expiration est indiquée sur les flacons et les cartons.

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

Aucun antibiotique, additif instable ou conservateur n'a été ajouté par le fabricant à PureSperm®100.

Précautions et avertissements

- Lors de la récupération de la granule de sperme, suivre les instructions figurant sur la notice du produit afin d'éviter toute contamination par inadvertance.
- Appliquer toujours des procédures aseptiques.
- Si des seaux scellés sont disponibles, les utiliser pendant la centrifugation pour éviter la création d'aérosols.
- Nettoyer les pertes accidentelles à l'aide d'un chiffon ou d'un papier humide. PureSperm®100 rend les sols et les paillasses extrêmement glissants.
- PureSperm®100 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).
- Ne pas utiliser de solution montrant une contamination bactérienne.
- Ne pas utiliser le contenu si le sceau prouvant l'intégrité est brisé.
- La Federal Law des Etats-Unis restreint la vente de ce dispositif aux médecins ou sur ordonnance.
- Vérifier la légalité de l'utilisation des produits des techniques de reproduction assistée dans votre pays.

Commandes

Volume	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

Flöjelbergsgatan 16 B
SE-431 37 Mölndal
Suède
Tél. : +46-31-703 06 30
Fax : +46-31-40 54 15
E-mail : contact@nidacon.com
www.nidacon.com

INS-PS100-M1/03

Recommandations

Préparer deux gradients de PureSperm® pour chaque échantillon de sperme. Ceci réduit le risque de surcharge d'un seul gradient, assure la sécurité lors de la manipulation des tubes ou la récupération des granules de sperme. Ceci réduit le risque de surcharge d'un seul gradient, assure la sécurité lors de la manipulation des tubes ou la récupération des granules de sperme et permet d'obtenir deux tubes pour équilibrer le rotor de la centrifugeuse.

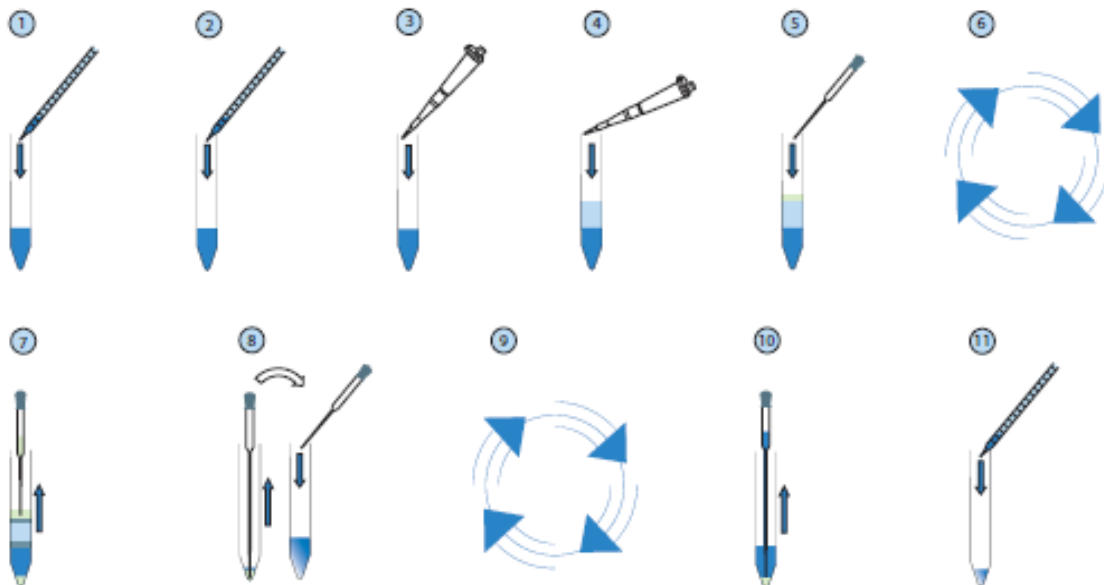
Réactifs et équipements

- PureSperm®100, PureSperm® Buffer et PureSperm®Wash
- Centrifugeuse avec rotor basculant sur paillasse.
- Tubes à centrifuger coniques stériles et jetables (de type Falcon 2075).
- Pipettes stériles de 2 ml et 10 ml.
- Pipettes stériles Pasteur.

Procédure de préparation de gradients de PureSperm® et séparation du sperme

Amener toutes les solutions à température ambiante.

1. Ajouter 2 ml de PureSperm® Buffer à 8 ml de PureSperm®100 de façon à obtenir 10 ml de PureSperm® à 80 %
2. Ajouter 6 ml de PureSperm® Buffer à 4 ml de PureSperm®@100 de façon à obtenir 10 ml de PureSperm® à 40 %
3. À l'aide d'une pipette à pointe stérile, ajouter 2 ml de PureSperm® à 80 % dans un tube à centrifuger conique
4. Utiliser une autre pipette stérile pour disposer avec précaution 2 ml de PureSperm® à 40 % en couche sur le PureSperm® à 80 %
5. À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, disposer soigneusement du sperme liquéfié (jusqu'à 1,5 ml) en couche sur le PureSperm®
6. Centrifuger à 300 x g pendant 20 minutes. Ne pas utiliser le frein.
7. Utiliser une nouvelle pipette Pasteur stérile et aspirer, dans un mouvement circulaire en surface, tout sauf la granule et 4 à 6 mm de PureSperm® à 80 %. Si aucune granule n'est observée après centrifugation, retirer tout le liquide sauf les derniers 0,5 ml.
8. Utiliser une nouvelle pipette Pasteur pour aspirer la granule (ou les derniers 0,5 ml de liquide). Transférer la granule de sperme dans un nouveau tube et remettre la granule en suspension dans 5 ml de PureSperm®Wash. Combiner deux granules de sperme si vous avez appliqué la double procédure.
9. Centrifuger à 500 x g pendant 10 minutes. Ne pas utiliser le frein.
10. Aspirer le surnageant PureSperm®Wash en laissant le minimum de liquide possible au-dessus de la granule. Si aucune granule n'est visible, laisser les derniers 0,25 ml de liquide.
11. Remettre la granule de sperme en suspension dans un volume adéquat de milieu de culture pour obtenir la concentration de sperme requise. L'échantillon de sperme est désormais prêt pour analyse ou utilisation.



Annexe 2. Fiche technique de FertiCult™ Flushing medium

FertiCult™ Flushing medium

Cell culture medium for washing of human ova, spermatozoa and embryos, for swim-up of spermatozoa, sperm injection in ICSI, intra uterine insemination and embryo transfer

Document reference: FP09 I08 R01 B.2, Update: 28/SEP/2011

STERILE A

USED ABBREVIATIONS

ICSI Intracytoplasmic Sperm Injection
IUI Intra uterine insemination

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 techniques of human spermatozoa, sperm injection in oocytes during ICSI, introduction of washed spermatozoa in the uterus (IUI) and for embryo transfer. The medium is complete and needs no further additives. The medium contains HEPES; no CO₂ incubation is required. FertiCult Flushing medium does not contain heparin, thus for oocyte pick-up, use FertiCult Aspiration 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 bicarbonate, physiologic salts, glucose, lactate and human serum albumin (4.00g/liter).

Gentamicin Sulphate can be added upon request (10 mg/liter).

MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

Product code	Product description
FLUSH020	9 x 20ml of FertiCult Flushing medium
FLUSH22.8	1x22.8ml of FertiCult Flushing medium
FLUSH050	5x50ml of FertiCult Flushing medium
FLUSH100	3x100ml of FertiCult Flushing medium
FLUSH_002_PHR	1x2ml of FertiCult Flushing medium with Phenol Red
FLUSH020PHR	9 x 20ml of FertiCult Flushing medium with Phenol Red
FLUSH050PHR	5x50ml of FertiCult Flushing medium with Phenol Red
FLUSH100PHR	3x100ml of FertiCult Flushing medium with Phenol Red
FLUSH500PHR	1x500ml of FertiCult Flushing medium with Phenol Red
FLUSH100PHR_G	3x100ml of FertiCult Flushing medium with Phenol Red and Gentamicin
FLUSH500PHR_G	1x500ml of FertiCult Flushing medium with Phenol Red and Gentamicin

MATERIAL NOT INCLUDED WITH THE KIT

- Incubator at 37°C (No CO₂)
- Petri dishes
- Microscope
- Test tubes
- LAF bench (ISO 5 environment)
- Syringe (e.g. 1ml Plastipack)
- Catheter

PRODUCT SPECIFICATIONS

- Chemical composition
- pH: between 7.30-7.60 (Release criteria)
- Osmolality: 270-290 mOsm/kg
- Sterility: sterile (SAL 10⁻³)
- Endotoxins: < 0.25 EU/ml
- Mouse Embryo Assay (blastocysts after 96h): ≥ 80% after 30min of exposure (zygote stage)
- Use of Ph Eur or USP grade products if applicable
- Certificate of analysis and MSDS 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 defect 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 (sun)light
- 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 inactivation/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 (suggested procedure)

The washing of spermatozoa can be done at room temperature or at 37°C.

1. Add 5 ml FertiCult Flushing medium to the native semen sample and mix. Centrifuge for 15 minutes at approximately 300g.
2. Remove supernatant and leave about 0.5mL of semen in the centrifuge tube.
3. Add 5ml FertiCult Flushing medium to the test-tube. Mix the solution gently until the pellet is completely dissolved.
4. Centrifuge again for 10 minutes at 300g.
5. Perform a swim-up.

Swim-up procedure (according to WHO, 2010)

1. Mix the semen sample (or semen/medium mix after performing "Washing of spermatozoa" procedure) well
2. Place 1ml of semen in a sterile 15-ml conical centrifuge tube, and gently layer 1.2ml of FertiCult Flushing medium over it. Alternatively, pipette the semen carefully under the medium.
3. 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.
4. Gently return the tube to the upright position and remove the uppermost 1ml of medium. This will contain highly motile sperm cells.
5. Dilute this with 1.5-2.0ml of FertiCult Flushing medium.
6. Centrifuge at 300-500g for 5 minutes and discard the supernatant.
7. Resuspend the sperm pellet in 0.5ml of FertiCult Flushing medium.

Embryo transfer (according to Brinsden, 2005)

1. Take a sterile syringe, fill with FertiCult Flushing medium, and eject air bubbles. Attach the syringe to a catheter, and eject the medium.
2. Draw up FertiCult Flushing medium into the syringe and push down the piston to the 10µl calibration mark.
3. Draw up the embryo(s) into the catheter so that the volume to be transferred is approximately 20-30µl.
4. Hand catheter and syringe to the clinician for insertion and transfer in the uterus.

BIBLIOGRAPHY

1. WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen, 5th Edition, World Health Organisation (2010).
2. Brinsden P.R. (2005). Bourn Hall Clinic Procedures and Protocols. A textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction, 3rd edition, Taylor & Francis. Procedure No. K.7.



FertiPro NV - Industriepark Noord 32 - 8730 Beernem
Tel +32 (0)50 79 18 05 - Fax +32 (0)50 79 17 99
URL: www.fertipro.com - E-mail: info@fertipro.com

Annexe 3. Fiche technique de FertiCult™ IVF medium

FertiCult™ IVF medium

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

Document reference: FP09 I07 R01 B.2, Update: 01/OCT/2012

STERILE A

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/v can be added.

FertiCult IVF medium is suitable for micro-droplets under oil or equally suited to culture in Falcon 3037 organ culture dishes (also 4-well Nunc culture dishes).

As with all IVF media, FertiCult IVF medium has to be **pre-incubated in CO₂ incubator with 5% CO₂ for 24 hours before use** (with lid opened).

MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

Product code	Product description
FECU020	5 x 20ml FertiCult IVF medium
FECU050	5 x 50mL FertiCult IVF medium
FECU100	3 x 100mL FertiCult IVF medium
FECU020PHR	5 x 20ml FertiCult IVF medium w/ phenol red
FECU050PHR	5 x 50mL FertiCult IVF medium w/ phenol red
FECU100PHR	3 x 100mL FertiCult IVF medium w/ phenol red
FECU020PHR_G	5 x 20ml FertiCult IVF medium w/ phenol red and Gentamicin
FECU050PHR_G	5 x 50mL FertiCult IVF medium w/ phenol red and Gentamicin
FECU100PHR_G	3 x 100mL FertiCult IVF medium w/ phenol red and Gentamicin

MATERIAL NOT INCLUDED WITH THE KIT

- Incubator at 37°C (5% CO₂)
- Petri dishes (e.g. Falcon 3037)
- Mineral oil (e.g. FertiCult Mineral Oil)
- Laminar flow bench (ISO5 environment)
- Microscope
- Test tubes

PRODUCT SPECIFICATIONS

- Chemical composition
- pH: between 7.20 - 7.50 (37°C - 5 % CO₂)
- Osmolality: 270 - 290 mOsm/kg
- Sterility: sterile (SAL 10⁻³)
- Endotoxins: < 0.25 EU/ml
- Mouse Embryo Assay (blastocysts after 96h culture): ≥ 80% (48h exposure from zygote stage)
- Use of Ph Eur or USP grade raw materials if applicable
- Certificate of analysis and MSDS 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 defect 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 (sun)light
- 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 was found negative when tested for antibodies to HIV and HCV and non-reactive for HbsAg, HBV RNA, HCV RNA, HIV-1 RNA 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

PREPARATIONS FOR USE OF MICRO-DROPLETS

For micro-droplets, between 100-250µl of FertiCult IVF medium may be dispensed around the culture dish, up to 8 per 60mm dish.

The dish is then filled with 5ml of pre-washed and pre-equilibrated light mineral oil (nontoxic and preferably embryo tested, e.g. FertiCult Mineral Oil).

One oocyte is usually placed with about 10 000 sperm cells per micro-droplet, so if each patient during the next day is expecting 16 oocytes, 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% CO₂ in air.

Overnight equilibration is highly recommended.

PREPARATIONS FOR USE IN OPEN SYSTEMS

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 holding and cleaning of oocytes during collection and then three dishes for overnight culture).

When using Nunc dishes, two 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% CO₂ 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 aspirates 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 rewashed, before then 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 procedures described above are for the first 24 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 past, where people have used cord serum or patient serum, the initial medium contains 10% and the changeover (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.

NB. 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 N.V. - Industriepark Noord 32 - 8730 Beernem, Belgium
Tel +32 (0)50 79 18 05 - Fax +32 (0)50 79 17 99
URL: <http://www.fertipro.com> - E-mail: info@fertipro.com

Annexe 4. Fiche technique de Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium

Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium

MEDIA FOR USE IN ART PROCEDURES

Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium is sterilised by sterile filtration



Document reference : FP09 I16 R01 B.2

Update: 21/10/2011

GENERAL INFORMATION

Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium contains 80 IU /mL pharmaceutical grade hyaluronidase from bovine origin, in FertiCult Flushing medium™. The product is ready for use.

Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium is used in the oocyte denudation process. Hyaluronidase digests the hyaluronic acid between the cumulus cells, which makes it easier to remove the cumulus mechanically.

MATERIAL INCLUDED IN THE KIT

Product Code: HYA001

1mL Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium

Product Code: HYA010

10mL Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium

MATERIAL NOT INCLUDED IN THE KIT

Incubator (no CO₂)

Petri dishes

Glass pipettes

Microscope

FertiCult™ Mineral Oil

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 defect when the product is delivered

INSTRUCTIONS FOR USE

- 1 Warm hyaluronidase to a temperature of 37°C.
- 2 Prepare a dish containing 1 droplet of hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium (100 µL) and 3-5 droplets (100µL) of FertiCult™ Flushing medium for oocyte washing (all under mineral oil e.g. FertiCult™ Mineral Oil).
- 3 Place oocytes in the hyaluronidase (up to 5 oocytes maximum) for about 30 seconds.
- 4 Using a fine glass pipette, transfer the partially denuded oocytes in the first washing droplet.
- 5 Remove the corona by pipetting the oocytes.
- 6 Use the other droplets to further wash the denuded oocytes.

Notice : Do not incubate in a CO₂ incubator. Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium is HEPES-buffered. Incubation in a CO₂ incubator will lower the pH.

PRODUCT SPECIFICATIONS AND QUALITY CONTROL

Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium is manufactured according to these specifications:

- pH: 7.20 - 7.60 (under air)
 - Osmolality: 270 - 290 mOsm/kg
 - Endotoxin: < 1.00 EU/mL
 - Sterility: Sterile
 - Mouse-embryo test: ≥ 80% blastocysts after 96 hours culture (exposure at zygote stage)
 - Use of Ph Eur or USP grade products if applicable
- A certificate of analysis is available on request.

STORAGE INSTRUCTIONS

- Store between 2-8°C
- Do not freeze before use
- Keep away from (sun)light
- 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 inactivation/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.

Handle all specimens as if capable of transmitting HIV or hepatitis. Always wear protective clothing when handling specimens.

The above media do not contain antibiotics, always work under strict hygienic conditions (laminary flow) to avoid contamination, or add your own antibiotics (gentamicin) at 10mg per mL.

Don't use media if cloudy.

BOVINE SOURCED HYALURONIDASE

The Pharmaceutical grade hyaluronidase used in this product is sourced bovine testis. It is certified not to contain any neuronal tissue.

According to the "WHO guideline on Transmissible Spongiform Encephalopathies in Relation to Biological and Pharmaceutical Product", and according to EC directive 2004/C24/03 "Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products (EMA/410/01) adopted by the Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) and by the Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP)", testis material from bovine source is classified as a "Category C: Tissues with no detected infectivity" product.



FertiPro N.V.
Industriepark Noord 32
8730 Beernem, Belgium.

URL: <http://www.fertipro.com>
E-mail: info@fertipro.com

Annexe 5. Fiche technique de 10 % PVP in FertiCult Flushing Medium

10% PVP in FertiCult Flushing Medium

VISCOUS MEDIUM FOR REDUCING SPERM MOTILITY

This product is sterilised by sterile filtration **STERILE | A**

Document reference : FP09 I17 R01 B.3

Update: 08/04/08

GENERAL INFORMATION

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) requires the capture of individual sperm cells in a glass pipette for injection into the oocyte.

This procedure is facilitated by first immobilizing the sperm. The most widely used method of immobilizing the sperm cells is by placing them in a viscous medium prior to nicking the tail to immobilize the sperm completely.

10% (w/v) dialysed Ph Eur grade PVP in FertiCult Flushing medium is a viscous medium that can be used in ICSI procedures.

For use in human assisted reproduction techniques.

MATERIAL INCLUDED IN THE KIT

Product Code : PVP001

1x 1mL 10% PVP in FertiCult Flushing medium

Product code: PVP0.2

5x 0.2mL 10 % PVP in FertiCult Flushing medium

MATERIAL NOT INCLUDED IN THE KIT

Incubator at 37°C (no CO₂)

Petri dishes

Glass pipettes

FertiCult Mineral Oil

FertiCult Flushing medium

PRODUCT SPECIFICATIONS AND QUALITY CONTROL

10% PVP in FertiCult Flushing medium is manufactured according to these specifications:

- pH: 7.20 - 7.60
- Osmolality: 280 - 320 mOsm/kg
- Endotoxin: < 1.0 EU/mL
- Sterility assurance level: 10⁻³
- Mouse-embryo test: ≥ 80% blastocysts after 30 min exposure
- Viscosity: > 170 cP at 25°C
- Use of Ph Eur or USP grade products if applicable

A certificate of analysis for this product is available on request.

10% PVP in FertiCult Flushing medium has been evaluated by an independent test laboratory using the ISO10993-5/USP30-NF 25 Agar Diffusion test for cytotoxicity. The product was considered non-cytotoxic.

INSTRUCTIONS FOR USE

Standard procedure

1. Warm the PVP solution to a temperature of 37°C.
2. Place a small drop of PVP solution (5µL-10µL) in a dish and cover with FertiCult Mineral Oil.
3. Add a small volume (1-2 µL) of washed sperm into the centre of the PVP droplet.
4. Incubate for a few minutes to allow sperm to migrate to the periphery of the droplet.
5. Select and recover the spermatozoa for injection.

Alternative procedure with extra washing step

1. Warm the PVP solution and FertiCult Flushing medium to a temperature of 37°C.
2. Place a small drop of PVP solution (5µL-10µL) and 1 or more small drops FertiCult Flushing medium in a dish and cover with FertiCult Mineral Oil.
3. Add a small volume (1-2 µL) of washed sperm into the centre of the PVP droplet.
4. Incubate for a few minutes to allow sperm to migrate to the periphery of the droplet.
5. Select the spermatozoa for injection and nick (break) the tail of the spermatozoon with the tip of the glass pipette.
6. Transfer the spermatozoon into one of the FertiCult Flushing medium droplets and wash by transferring the sperm cell in and out of the Flushing medium several times.
7. Suck the sperm cell into the glass pipette and use for ICSI procedure.

Notice : Do not incubate in a CO₂ incubator. 10% PVP in FertiCult Flushing medium is HEPES-buffered. Incubation in a CO₂ incubator will lower the pH.

STORAGE AND CONSERVATION

Store product upon arrival at 2-8°C.

Keep from light.

WARNING AND PRECAUTION

All human, organic material should be considered potentially infectious.

Handle all specimens as if capable of transmitting HIV or hepatitis. Always wear protective clothing when handling specimens.

The above media do not contain antibiotics, always work under strict hygienic conditions (laminary flow) to avoid contamination, or add your own antibiotics (e.g. penicillin at about 100 units per mL).

Don't use media if cloudy.

Bibliography

Gianaroli L., et al, *ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories*, Hum Rep (2000), Vol.15, no.10, pp.2241-2246

Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction, The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice 3rd Edition, Ed: Brinsden PR, Taylor and Francis, 2005, pp. 342-343

10% PVP in FertiCult Flushing medium is produced by:
FertiPro N.V., Industriepark Noord 32
8730 Beernem, Belgium.
URL: <http://www.fertipro.com>
E-mail: info@fertipro.com

Annexe 6. Fiche technique de FertiCult Mineral Oil

Mineral Oil

FertiCult Mineral Oil

Light mineral oil for use in IVF, ICSI and related ART procedures

FertiCult Mineral Oil is sterilized by filtration and aseptic filling

STERILE	A
---------	---

Document reference: FP09 I20 R01 A.9
Update: 29/10/2009

GENERAL INFORMATION

FertiCult Mineral Oil is pre-washed, ready to use, light mineral oil (d=0.83-0.86g/mL) for use in IVF, ICSI and related artificial reproductive techniques.

FertiCult Mineral Oil has to be pre-incubated in a CO₂ incubator for 24 hours before use (with lid open).

INTENDED USE

Culture medium overlaid with oil was first used in the early 1960's as a technique for the culture of mammalian embryos. The oil permits small volumes of medium to be used for fertilization and embryo culture.

Use of oil prevents the evaporation of media, thereby reducing the harmful effects of increased osmolality. Furthermore, the use of an oil overlay reduces changes in pH caused by loss of CO₂ from the medium when culture dishes are taken out of the incubator for embryo examination. Finally, culture of multiple embryos in small volumes of medium under oil promotes the concentration of autocrine growth factors secreted by the developing embryos, leading to enhanced rates of embryo development.

MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

Productcode: MINOIL50
1 x 50mL FertiCult Mineral Oil

Productcode: MINOIL100
1 x 100mL FertiCult Mineral Oil

Productcode: MINOIL500
1 x 500mL FertiCult Mineral Oil

MATERIAL NOT INCLUDED WITH THE KIT

- CO₂ Incubator
- Petri dishes
- Cell culture media
- Laminar flow
- Microscope
- Test tubes

PRODUCT SPECIFICATIONS AND QUALITY CONTROL

FertiCult Mineral Oil is manufactured according to these specifications:

- density: 0.83-0.86g/mL
- viscosity: < 30 cP at 30°C
- endotoxin: < 0.25 EU/mL

- sterility: SAL 10^{-3}
- mouse-embryo assay: $\geq 80\%$ blastocysts after 96 hours in culture
- use of pharmaceutical grade mineral (parafin) oil

A certificate of analysis is available upon request.

PRE-USE CHECKS

- do not use the product if it becomes (dis)coloured or shows any evidence of microbial contamination
- do not use the product if seal of the container is opened or defect when the product is delivered

INSTRUCTIONS FOR USE

FertiCult Mineral Oil is pre-washed so no further preparations are necessary. Simply place a bottle of FertiCult Mineral Oil in a CO₂ incubator at 5-6% CO₂ 24 hours prior to use.

FertiCult Mineral Oil can be used together with FertiCult IVF medium (FertiPro productcode: FECU020/050/100) and FertiCult G3 medium (G3020/050/100), contact FertiPro for more information about these products.

STORAGE AND CONSERVATION

Store FertiCult Mineral Oil between 15-25°C. When not in use store in original carton box to avoid prolonged exposure to light. After opening do not use the product for longer than 7 days. Do not use after expiry date. Keep away from sunlight.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

All human, organic material should be considered potentially infectious. Handle all specimens as if capable of transmitting HIV or hepatitis. Always wear protective clothing when handling specimens. Always work under strict hygienic conditions (laminar flow) to avoid contamination.

The oil may appear cloudy if removed from the incubator and allowed to stand at room temperature for extended periods of time. Such cloudiness usually disappears if the oil is re-equilibrated by replacing it in the incubator for several hours, if it does not disappear discard the product.



FertiPro N.V.
Industriepark Noord 32
8730 Beernem / Belgium
Website: www.fertipro.com
E-mail: info@fertipro.com

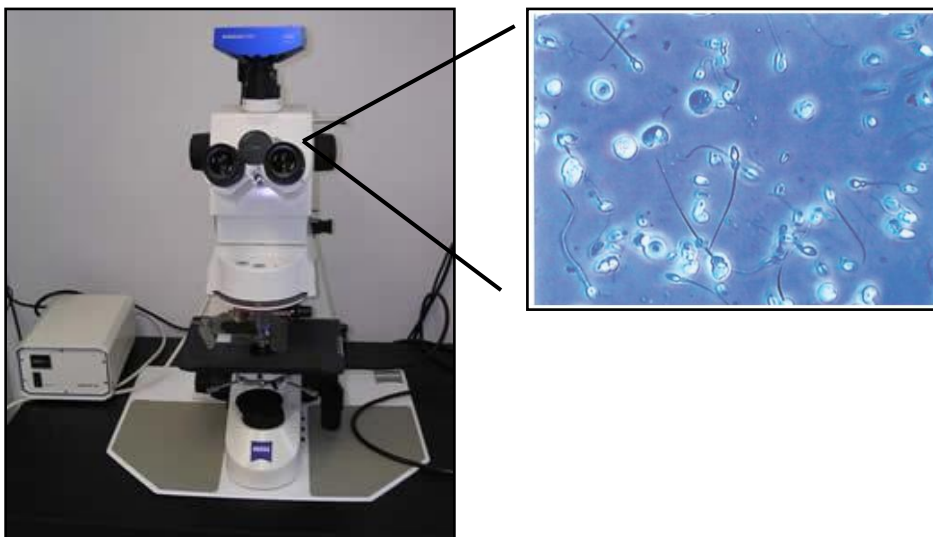


Annexe 7. Chambre de Makler



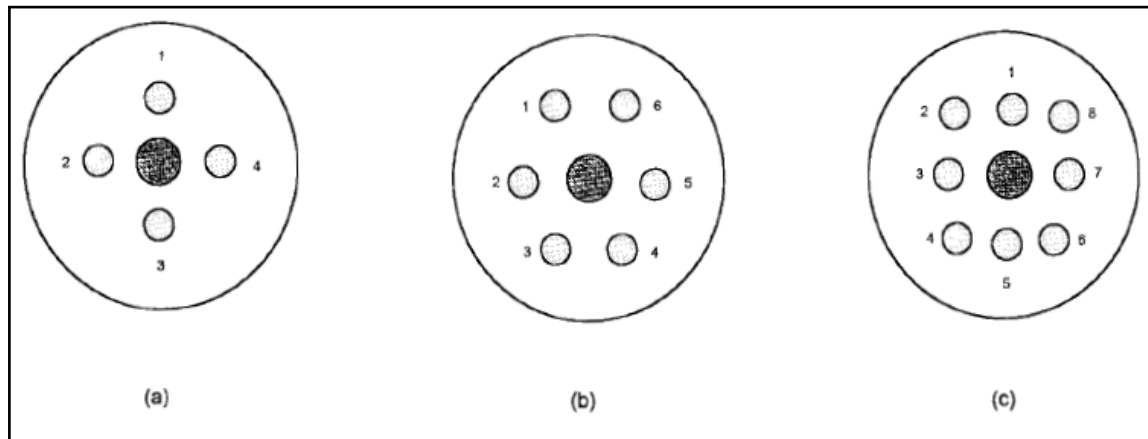
Cellule de comptage à profondeur déterminée pour l'obtention d'une monocouche de spermatozoïdes.

Annexe 8. Microscope à contraste de phase



Le microscope à contraste de phase est utilisé dans la visualisation des spermatozoïdes.

Annexe 9. Placement des gouttelettes de milieu de culture des ovocytes et de milieu visqueux PVP



(a) quatre gouttelettes de milieu de culture entourant la gouttelette de PVP ; (b) six gouttelettes de milieu de culture entourant la gouttelette de PVP ; (c) huit gouttelettes de milieu de culture entourant la gouttelette de PVP.

Annexe 10. Questionnaire aux couples candidats de l'ICSI

Questionnaire aux couples candidats de l'ICSI

Pour l'époux

Nom et prénom :

Age (date de naissance) :

Professions :

Si vous êtes stérile quelle est la cause de stérilité ?

.....

Etes- vous fumeur ? Oui Non

Prenez- vous du ? : Tabac : à fumer à chiquer

Alcool

Drogue

Combien de cigarette par jours fumez-vous ?.....

ATCD avant le prélèvement :

Vaccins

Médicaux

Chirurgicaux

Allergies

Infectieux

Familiaux

Autre

Fièvre

Pour l'épouse

Nom et prénom :

Age (date de naissance) :

Si vous êtes stérile quelle est la cause de stérilité ?

.....

ATCD :

- | | |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Vaccins | <input type="checkbox"/> Médicaux |
| <input type="checkbox"/> Chirurgicaux | <input type="checkbox"/> Allergies |
| <input type="checkbox"/> Infectieux | <input type="checkbox"/> Familiaux |
| <input type="checkbox"/> Autre | |

Pour le couple

Depuis quand avez- vous le désir d'avoir d'enfants?.....

La stérilité est : primaire secondaire

Prenez- vous déjà un traitement ? Oui Non

Le(s)quelle(s)? IAC FIV ICSI Autre

Résultat du traitement précédent : Pas de conception

Grossesse avec avortement

Grossesse et accouchement

Adresse :.....

Numéros de téléphone :.....

.....

.....

Glossaire

ADN polymérase I : enzyme qui catalyse la synthèse d'ADN au site d'hydrolyse des amorces (séquences d'ARN d'initiation de la réplication) par cette même enzyme lors de la réplication de l'ADN chez les procaryotes.

Agarose : polysaccharide linéaire formé d'une alternance de D-galactoses et de L-galactoses à très haut pouvoir gélifiant.

alpha-adrénergique : qualifie des récepteurs à la surface des cellules qui, à réception de l'adrénaline, déclenchent une vasoconstriction, un relâchement intestinal et une dilatation des pupilles.

Aménorrhée : absence de règles.

Anaérobie : se dit de micro-organismes qui se développent en l'absence d'oxygène.

Aneuploïdie : état d'une cellule ou d'un individu dont le lot chromosomique est caractérisé par la perte ou la présence surnuméraire d'un ou de plusieurs chromosomes entiers.

Anneau nucléaire : structure spécifique dont l'ADN de chromatine spermatique est attaché

Anosmie : perte totale ou partielle (on parle alors d'hyposmie) de l'odorat.

Anovulation : absence permanente ou temporaire d'ovulation.

Antioxydant : substance naturelle ou chimique destinée à diminué ou empêcher l'oxydation d'autre substance.

Appendice : prolongement d'un organe. Il en existe plusieurs dans le corps humain comme l'appendice iléocæcal entre l'intestin grêle et le gros intestin.

Appendicite : Inflammation de l'appendice.

Aspiration épидидymaire : opération qui consiste à aspirer le sperme depuis l'épididyme : tête, corps ou queue.

Barrière hémato-testiculaire : formée par des jonctions serrés de cellules de Sertoli séparant le compartiment de la lumière de tube séminifère et le compartiment interstitiel. Cette barrière met les cellules germinales portant des antigènes différents de ceux du sujet à l'abri du système immunitaire.

Bilharziose : maladie parasitaire due à l'infestation par des bilharzies (vers trématodes) ou schistosomes vivent dans l'appareil circulatoire de l'homme.

Blastocyste : embryon entre le 5^{eme} et le 7^{eme} jour après la fécondation, au moment de son implantation utérine. A ce stade qui succède à celui de Morula, l'œuf se creuse d'une cavité central et se divise en 2 ensembles cellulaires principaux : le trophoblaste et le bouton embryonnaire.

Blastomère : cellule résultant de la division de l'œuf fécondé.

Brucellose : maladie infectieuse due à une bactérie aérobie à gram négatif du genre *Brucella* transmise à l'homme par les animaux.

Caspases : (*aspartic-acid-specific cystein proteases*) sont un groupe de protéases à cystéine qui jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'apoptose, de nécrose et d'inflammation.

Cathéter : tuyau en matière synthétique, de calibre millimétrique et de longueur variable, peut être placé dans un vaisseau ou dans une cavité de l'organisme.

Cellules rondes : cellules leucocytaires et cellules de la lignée spermatique autre que les spermatozoïdes qui se trouve dans le sperme.

Centrifugation : séparation des éléments d'un mélange grâce à la force centrifuge.

Chlamidiose : maladie due à une bactérie du genre *Chlamydia* responsable de nombreuses affections génitales, oculaires, et respiratoires aiguës ou chronique.

Cryptorchidie : anomalie congénital de position du testicule due au fait que le testicule n'est pas descendu en suivant le trajet normal entre l'intérieure de l'abdomen et les bourses pendant la vie intra-utérine.

Curetage : opération consistant à vider de son contenu une cavité naturelle (utérus) ou pathologique.

Cytométrie en flux : technique de biologie cellulaire permettant de mesurer les caractéristiques morphologiques de cellules et l'intensité de la fluorescence qu'elles émettent après marquage avec un ou plusieurs colorants. La mesure de la fluorescence émise après coloration de l'ADN du noyau, permet d'évaluer la quantité d'ADN dans chaque cellule.

Dopamine : neurotransmetteur du groupe des catécholamines qui contrôle la motricité.

Ecographie : technique d'imagerie médicale utilisant les ultrasons.

Ectopie : localisation anormale, congénitale ou acquise d'un organe. Une grossesse ectopique est une grossesse extra-utérine qui se développe en dehors de la cavité utérine ; majoritairement dans la trompe de Fallope (grossesse tubaire).

Ejaculation par vibration : éjaculation assistée par un instrument vibreur.

Electro-éjaculation : éjaculation provoquée électriquement par un instrument mené d'une sonde placée dans le rectum.

Electrophorèse : technique qui permet de séparer les différents constituants d'un mélange chimique et qui sont ionisés sous l'action d'un champ électrique.

Endonucléase : une nucléase, qui coupe au milieu de la chaîne, d'un acide nucléique en fragments plus courts.

Endorphine : substance polypeptidique produite par certaines cellules du système nerveux central et ayant des propriétés analgésiques.

Epididymite : inflammation aigüe ou chronique de l'épididyme, le plus souvent d'origine infectieuse.

Epispadias : malformation congénitale dans laquelle le méat urétral est situé sur la face dorsale du pénis.

Erection : gonflement et durcissement de certains organes (pénis). L'érection est déclenchée par une stimulation sexuelle. L'excitation des nerfs érecteurs de la moelle épinière provoque une dilatation des artères du pénis qui entraînent un afflux de sang dans le corps caverneux.

Espèces réactives oxygénées : ce sont les radicaux libres qui sont des molécules présentes dans certaines cellules et possèdent en périphérie un électron célibataire. Ces espèces comprennent l'atome d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygéné) etc. Elles proviennent de l'action de rayonnement producteurs d'énergie (lumière, rayons) et de réactions biochimiques sur l'oxygène.

Etude longitudinale : étude où il existe un laps de temps entre les différentes variables, de sorte qu'on puisse établir une séquence temporelle entre elles.

Filariose lymphatique : maladie parasitaire des ganglions et des vaisseaux lymphatiques due à l'infestation par les filaires qui sont des vers filiformes.

Fimbria : un mot latin signifiant frange. Dans l'appareil reproducteur féminin, la *fimbria* est une frange de tissu conduisant de l'ovaire aux trompes de Fallope.

Fluorochrome : dispositif qui permet le marquage des éléments comme les anticorps.

Homozygote : se dit d'un individu dont les deux copies d'un même gène (chacune portée par l'un des deux chromosomes homologues d'une paire) sont identiques.

Hormone chorionique gonadotrophique : hormone polypeptidique sécrétée par le placenta durant les premiers mois de la grossesse.

Hyperandrostéronisme : Sécrétion anormalement élevée chez la femme des androgènes par la glande surrénale et les ovaires.

Hyperstimulation ovarienne: résultats de l'administration de HCG pour déclencher l'ovulation dans une femme qui est a subit une stimulation folliculaire trop poussée avec des gonadotrophines.

Hypogonadisme hypogonadotrophique : affection caractérisée par une insuffisance de fonctionnement des gonades. Le hypogonadisme hypogonadotrophique congénital est du à un déficit en gonadolibérine (GnRH).

Hypophyse : petite glande endocrine reliée à la partie antérieure du cerveau.

Hypothalamus : région centrale du diencephale située à la base du cerveau, sous les thalamus et au dessus de l'hypophyse, qui lui est reliée par une tige pituitaire.

Implantation : fixation de l'ovule fécondé dans la muqueuse utérine 6 jours après la fécondation.

Lactotrope : cellule antéhypophysaire sécrète la prolactine.

Liquéfaction : transformation de sperme qui est un gel épais au moment de l'éjaculation à un liquide après un certain temps (20 minutes).

Ménopause : interruption physiologique des cycles menstruels, due à la cessation de la sécrétion hormonale des ovaires (œstrogènes et progestérone). La ménopause survient entre 40 et 55 ans.

Méta-analyse : consiste à rassembler les données issues d'études comparables et à les réanalyser au moyen d'outils statistiques adéquats.

Métaux non essentiels : ce sont les oligo-éléments qui sont une classe de nutriments, sous forme des éléments minéraux purs nécessaires à la vie d'un organisme, mais en quantités très faibles qui représentent une masse inférieure à 1 mg/kg, comme le Fer et le Manganèse.

Microdélétion : perte d'une infime partie du chromosome.

Microscopes à contraste de phase: microscope optique qui permet d'augmenter le contraste entre les objets plus au moins denses, présent dans la préparation observée. Le champ est sombre.

Mucoviscidose : maladie héréditaire caractérisée par une viscosité anormale du mucus que sécrètent les glandes pancréatiques et bronchiques.

Mucus : substance visqueuse, composée de protéines et de glucides appelés mucine sécrétée par les cellules mucipares des muqueuses (respiratoires, digestives, génitales).

Narcotique : synonyme de stupéfiant ; provoque un assoupissement, un relâchement des muscles et une diminution de la sensibilité pouvant aller jusqu'à l'anesthésie.

Normozoospermie : sperme, dont les paramètres entrent dans les normes des valeurs de référence de l'OMS.

Nucléases : sont des enzymes qui coupent les liaisons phosphodiester des brins d'acide nucléique entre deux nucléotides.

Paraffine : mélange d'hydrocarbures constituant une substance solide blanche.

Phénotype : ensemble des caractéristiques corporelles d'un organisme, et qui sont l'expression morphologique de certains éléments du génotype.

Plexus pampiniforme : réseau constitué par les veines testiculaires autour de l'artère testiculaire. Ce plexus absorbe la chaleur du sang artériel afin de le rafraîchir avant son entrée dans le testicule.

Polyspermie : fusion accidentelle de plusieurs spermatozoïdes avec l'ovule. Elle conduit à une cellule-œuf polyploïde non viable.

Post-partum : période s'étendant de l'accouchement au retour de couches utérines (réapparition des règles). Il dure environ 6 semaines lorsque la mère n'allait pas, plus longtemps si elle allaite.

Prolactine : hormone polypeptidique sécrétée par les cellules lactotropes de l'antéhypophyse responsable de la lactation, inhibé par la dopamine.

Pronucléus : se dit de chacun des noyaux provenant des gamètes mâles et femelle, présents dans le cytoplasme de l'œuf après la fécondation et avant leur fusion (ou la désorganisation de leurs enveloppes nucléaires qui précède la première division de segmentation).

Puerpéral : relatif à la période qui suit l'accouchement.

Pulsatilité : sécrétion sous forme des pulses. Le pulse est un épisode de libération hormonale dans le sang, intense mais bref donc il est caractérisé par une montée rapide des concentrations sanguines suivie d'une diminution de type exponentielle.

Réaction corticale : modification de la zone pellucide due à l'exocytose des granules corticaux pour le blocage de la polyspermie.

Récepteur : molécule capable d'établir des interactions spécifiques avec une molécule signal (on dit qu'il y a reconnaissance) qui représentent le point de départ d'une réponse spécifique de la cellule à ce signal. Par exemple, un récepteur hormonal se lie à l'hormone et déclenche la réponse de la cellule cible.

Sclérose en plaque : maladie démyélinisante du système nerveux central, se traduisant par un durcissement apparaissant sous forme de plaques de la substance blanche.

Sédatif : médicament qui calme l'activité d'un organe ou du psychisme.

Sonication : utilisation d'ultra-sons pour rompre les membranes cellulaires ou des agrégats moléculaire.

Spermiation : processus de libération d'une spermatide allongée par sa cellule de Sertoli du tube séminifère. Lors de cette étape, la spermatide va perdre son cytoplasme qui sera phagocyté par la cellule de Sertoli.

Stérilité primaire : absence de grossesse après un minimum d'un an de rapports sexuels réguliers non protégés chez une femme qui n'a jamais eu de grossesse.

Stérilité secondaire : absence de grossesse après un minimum d'un an de rapports sexuels réguliers non protégés chez une femme qui a déjà eu une ou plusieurs grossesses menées à terme ou d'avortement.

Stupéfiant : substance médicamenteuse ou non dont l'action sédatrice, analgésique (morphine), narcotique provoque à long terme une accoutumance et une pharmacodépendance.

Syndrome de Kallmann : Insuffisance congénitale de stimulation des gonades due à un déficit en gonadolibérine, souvent associée à un déficit de l'adorât.

Système d'excision : une forme de réparation enzymatique de l'ADN pendant la réplication qui consiste à enlever et éliminer la base endommagée suivie par son remplacement par la base correcte.

Thyreolibérine : (Thyrotropin Releasin Hormon ou TRH), hormone hypothalamique stimule la production de TSH (Thyroid Stimulating Hormon) antéhypophysaire.

Topoisomérase II : les topoisomérases sont des enzymes responsables des superenroulements de l'ADN. Les topoisomérases II coupent les deux brins d'ADN puis les ressoudent après avoir créé des superenroulements.

Translocation : transfert d'un fragment de chromosome sur un chromosome non homologue.

Trophoblaste : couche cellulaire périphérique de l'œuf, formée lorsque celui-ci est encore au stade blastocyste et qui est l'origine du placenta.

Typhoïde : septicémie provoquée par une bactérie à Gram négatif, *Salmonella typhi* ou bacille d'Eberth.

Ulcération : processus caractérisé par une perte de substance de la peau ou d'une muqueuse.

Vasectomie : section chirurgicale des deux canaux déférents.

Zone pellucide : chez les mammifères, enveloppe de l'ovocyte, formée de trois glycoprotéines (ZP1, ZP2 et ZP3) sécrétées par le jeune ovocyte. La ZP3 intervient dans la reconnaissance entre les gamètes.

Zygote : l'œuf fécondé.

Résumé : Etude de la valeur prédictive de la fragmentation d'ADN spermatique pour le succès de la fécondation *in vitro* par microinjection intracytoplasmique de spermatozoïde

Cette étude a pour objectif principal la détermination d'une relation, exprimée par la valeur prédictive, entre la fragmentation de l'ADN spermatique (FAS) et la réussite de l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI).

L'intégrité de l'ADN spermatique de 26 patients candidats à l'ICSI a été mesurée par le test de SCD (Sperm Chromatin Dispersion). Les résultats ont été exprimés par l'indice de fragmentation d'ADN (IFA) avec un seuil de 30%. L'IFA a été étudié en fonction de paramètres généraux (âge des hommes, antécédents de recours à une technique de procréation, tabagisme et numération et mobilité des spermatozoïdes) ainsi que des paramètres relatifs à la reproduction (fécondation des ovocytes, qualité des embryons, grossesse biochimique et clinique et naissance). L'influence de l'âge de la femme sur les paramètres de reproduction a été également étudiée.

Nous avons trouvé une corrélation négative de l'IFA avec la numération et la mobilité des spermatozoïdes mais nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les couples avec un $IFA \leq 30\%$ et ceux avec un $IFA > 30\%$ du point de vue grossesse biochimique et clinique et de la naissance. Cependant, la qualité des embryons a été significativement meilleure chez les couples avec un $IFA > 30\%$. L'âge des femmes n'a pas montré d'influence sur les paramètres de reproduction. La FAS n'a pas de valeur prédictive pour l'ICSI qui est donc un traitement conseillé pour les patients avec un taux élevé de cassures de l'ADN spermatique.

Mots clés : Fragmentation de l'ADN spermatique/ ICSI/ SCD/ Spermatozoïde.

Abstract: Study of the predictive value of sperm DNA fragmentation for the success of the intracytoplasmic sperm injection

The main objective of this study is the determination of a relationship expressed by the predictive value between sperm DNA fragmentation (SDF) and the success of intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

Sperm DNA integrity of 26 patients that are candidates for ICSI was measured by the Sperm Chromatin Dispersion test (SCD). The results were expressed as the DNA fragmentation index (DFI) with a threshold of 30%. The DFI has been studied following some general parameters (men age, history of use of a reproductive technique, smoking, sperm count and sperm motility) and other parameters related to reproduction (oocytes fertilization, embryo quality, biochemical and clinical pregnancy and birth). The influence of women age on reproductive parameters was also studied.

We found a negative correlation of the DFI with sperm count and sperm motility but we did not find significant differences between couples with $DFI \leq 30\%$ and those with a $DFI > 30\%$ in terms of biochemical and clinical pregnancy as well as birth. However, embryo quality was significantly better among couples with a $DFI > 30\%$. Women's age showed no influence on reproductive parameters. DFI has no predictive value for ICSI, a treatment recommended for patients with high levels of sperm DNA breaks.

Key words: Sperm DNA Fragmentation/ ICSI/ SCD/ Spermatozoa.

ملخص: دراسة القيمة التوقعية لانكسار الحمض النووي المنوي لنجاح التلقيح الاصطناعي المجهري

تهدف هذه الدراسة إلى إقامة علاقة معبر عنها بالقيمة التوقعية بين انكسار الحمض النووي للحيوانات المنوية و نجاح التلقيح الاصطناعي المجهري .

تم فحص الحمض النووي للحيوانات المنوية لـ 26 مريض مرشح لعملية التلقيح الاصطناعي المجهري بواسطة اختبار انتشار الكروماتين المنوي. النتائج عبر عنها بمؤشر انكسار الحمض النووي مع عتبة 30%. نتائج عملية التكاثر تتجسد في تخصيب البويضات, نوعية الأجنة, الحمل البيوكيميائي والإكلينيكي والولادة.

لا يوجد فرق ذو معنى بين المرضى الأقل من 30% و الأكثر من 30% من وجهة نظر تخصيب البويضات, الحمل البيوكيميائي و الإكلينيكي والولادة, لكن نوعية الأجنة كانت بشكل ذو معنى أحسن عند فئة الأكثر من 30%.

لا توجد قيمة توقعية لانكسار الحمض النووي لنجاح التلقيح الاصطناعي المجهري و الذي يعتبر علاج منصوح به للمرضى الذين يعانون من نسب عالية من انكسار الحمض النووي المنوي.

الكلمات المفتاحية: انكسار الحمض النووي المنوي - التلقيح الاصطناعي المجهري - انتشار الكروماتين المنوي - الحيوان المنوي