

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2006

N°

MEMOIRE DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury interrégional

le vendredi 23 juin 2006

par Mme CLOUET-LESKE Anne-Claire

**Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 23 janvier 2003 tient lieu de :**

THESE
POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET SPERMATOGENESE :

**Application de la technique TUNEL pour l'évaluation du taux de
fragmentation de l'ADN du spermatozoïde**

Président : Mme Berthe-Marie IMBERT, Professeur, Pharmacie

Membres du Jury : M. Paul BARRIERE, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
Médecine

M. Miguel JEAN, Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier, Médecine (Directeur
de Thèse)

Mme Sophie MIRALLIE, Praticien Hospitalier, Pharmacie

TABLE DES MATIÈRES

FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET SPERMATOGENESE :	1
Chapitre 2 PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION	7
1. La femme	7
1.1 L'appareil génital féminin	7
1.2 Ovogenèse et ovulation	8
1.3 Follicules et folliculogenèse	9
1.4 Les sécrétions hormonales de l'ovaire	11
2. L'homme	12
2.1 L'appareil génital masculin	12
2.2 Le testicule	12
2.2.1 Morphologie	12
2.2.2 Histologie	12
2.2.3 Vascularisation	14
2.3 Spermatogenèse	14
2.4 Régulation de la fonction testiculaire	17
3. La fécondation <i>in vivo</i>	18
Chapitre 3 APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE DE L'INFERTILITE	19
1. Définitions et rappels épidémiologiques de l'infertilité	20
1.1 La fécondité	20
1.2 La fertilité	20
1.3 La stérilité	20
1.4 Mesures de l'infertilité	21
1.4.1 Le délai nécessaire à concevoir (DNC)	21
1.4.2 La fécondabilité	21
2. Bilan d'infertilité masculine	21
2.1 Eléments de l'interrogatoire	21
2.1.1 Données communes au couple	21
2.1.2 Interrogatoire de l'homme	21
2.2 Examen clinique de l'homme	22
2.3 Bilan biologique masculin	22
2.3.1 Analyse spermiologique	22
2.3.2 Bilan hormonal	27
2.4 Bilan génétique	27
2.4.1 Caryotype	27
2.4.2 Recherche de la microdélétion du chromosome Y	27
2.4.3 Recherche de mutations du gène CFTR	28
2.5 Biopsie testiculaire	28
2.6 Sérologies réglementaires	28
3 Causes et facteurs influençant la fertilité masculine	28
3.1 Causes d'infertilité masculine	28
3.2 Facteurs influençant la fertilité masculine	29
4. Approches thérapeutiques proposées	30
4.1 Stimulation ovarienne simple	30
4.2 Techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP)	30
4.2.1 Insémination intra-utérine (IIU)	31
4.2.2 Fécondation <i>in vitro</i> (FIV)	31
5.1 Introduction	33
5.2 Revue bibliographique	33
5.3 Matériels et Méthodes	34
5.3.1 Les patients	34
5.3.2 L'enquête	35
5.4 Résultats	35
5.5 Discussion	38

Chapitre 4 DETERMINATION DU TAUX DE FRAGMENTATION DE L'ADN SPERMATIQUE SELON LA TECHNIQUE TUNEL,	40
1.INTRODUCTION	41
2.REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	41
3.MATERIELS ET METHODES	43
3.1 Les patients, critères d'inclusion/exclusion	43
3.2 Les prélèvements.....	43
3.3 La technique TUNEL	44
3.3.1 Principe de la technique TUNEL	44
3.3.2 réalisation de la technique.....	45
4. RESULTATS.....	47
4.1 Présentation des résultats.....	47
4.2 Analyse des résultats	50
Partie1 : Analyse des 44 premiers résultats	50
Partie 2 : Etude de relation entre le taux de fragmentation et divers événements	52
Partie 3 : Etude de relation entre l'indice de fragmentation et divers événements.....	61
Partie 4 : Détermination d'une valeur seuil critique	63
5 Discussion	66
CONCLUSION	69
ANNEXES	71
BIBLIOGRAPHIE.....	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Paramètres du spermogramme, normes OMS (2004)

Tableau II : Les techniques AMP et leurs principales indications

Tableau III : Comparaison des données obtenues pour 2 cohortes interrogées

Tableau IV : Etapes de la technique TUNEL

Tableau V : Résultats de l'étude TUNEL

Tableau VI : Analyse intermédiaire

Tableau VII : Comparaison des résultats FIV-C versus FIV-ICSI

Tableau VIII et IX : Taux de fragmentation et fécondation des ovocytes

Tableau X et XI : Taux de fragmentation et qualité embryonnaire

Tableau XII et XIII : Taux de fragmentation et absence de grossesse

Tableau XIV et XV : Taux de fragmentation et arrêt de grossesse

Tableau XVI : Taux de fragmentation et paramètres du spermogramme

Tableau XVII : Synthèse, taux de fragmentation

Tableau XVIII : Indice de fragmentation

Tableau XIX : Synthèse, indice de fragmentation

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : coupe sagittale médiane de l'appareil génital féminin

Figure 2 : ovogenèse

Figure 3 : l'ovaire aux différentes phases du cycle

Figure 4 : contrôle endocrinien de la fonction ovarienne

Figure 5 : coupe sagittale médiane de l'appareil génital masculin

Figure 6 : structure générale du testicule

Figure 7 : maturation des cellules germinales au sein des tubes séminifères

Figure 8 : spermatogenèse

Figure 9 : contrôle neuro-endocrinien de l'appareil génital masculin

Figure 10 : zygote

Figure 11 : schéma d'une coupe longitudinale d'un spermatozoïde de morphologie normale

Figure 12 : test de capacitation survie

Figure 13 : répartition des causes d'infertilité

Figure 14 : répartition des causes d'infertilité masculine

Figure 15 : schéma du principe de la technique TUNEL

Figure 16 : photographie d'un frottis de sperme capacité après coloration ApoptoTag (x100)

Figure 17 : numération des spermatozoïdes en fonction du taux de fragmentation de l'ADN

Figure 18 : pourcentage de mobilité progressive en fonction du taux de fragmentation de l'ADN

Figure 19 : pourcentage de formes normales en fonction du taux de fragmentation de l'ADN

Figure 20 : taux de fragmentation en fonction de l'âge du patient

Figure 21 : courbe de ROC

Figure 22 : courbe de ROC pour l'événement « qualité embryonnaire à J2 »

Chapitre 1 INTRODUCTION

Près de 8% des couples en âge de procréer rencontrent un problème de fécondité à un moment de leur vie. Il est aujourd'hui possible de déterminer la cause de l'infertilité au sein du couple dans plus de 90% des situations.

Pendant de nombreuses années, la femme était considérée comme seule responsable de cette infertilité, mais l'infertilité touche aussi bien l'homme que la femme. L'origine masculine de cette infertilité, qu'elle soit isolée ou mixte, est incriminée dans 59% des cas. La prise en compte de l'homme est donc incontournable.

Dans la majorité des cas, le bilan d'exploration masculin met en évidence des altérations des paramètres du sperme, dont les causes peuvent être anatomiques, chirurgicales, métaboliques, infectieuses... Toutefois, le rôle néfaste des facteurs environnementaux et professionnels sur la spermatogenèse est de plus en plus évoqué, car l'absence de traitement curatif des anomalies de la spermatogenèse fait prendre conscience de l'intérêt de la prise en compte de ces facteurs, afin de prévenir de l'apparition de ces anomalies.

Notre travail s'inspire précisément de cette observation. Nous avons donc entrepris de mettre en évidence si l'environnement exerçait réellement un rôle majeur sur la spermatogenèse, et s'il existait des moyens de prévention, à défaut de moyens thérapeutiques, vis à vis de ces facteurs environnementaux.

Après des rappels sur la physiologie de la reproduction et l'épidémiologie de l'infertilité, nous évoquerons la prise en charge du couple infécond, en accordant un intérêt plus particulier à l'exploration de l'infertilité masculine. Notre travail consistera ensuite à illustrer cette approche épidémiologique de l'infertilité masculine, grâce à l'exploitation de données recueillies au cours d'une enquête réalisée auprès de 389 patients du CHU de Nantes. Enfin, nous essaierons d'établir un lien entre l'environnement et les habitudes de vie de ces hommes et la qualité de leur sperme, en particulier de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes d'une part, et le développement précoce de l'embryon d'autre part.

CHAPITRE 2 PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

La fécondation rassemble l'ensemble des étapes biologiques aboutissant à la fusion des gamètes, et conduisant à la formation d'un œuf appelé zygote.

La formation des gamètes ou gamétogenèse constitue une étape majeure précédant la fécondation, car c'est au cours de cette étape que s'effectue d'une part la ségrégation des chromosomes sexuels, c'est à dire passage d'une cellule diploïde (23 paires de chromosomes homologues) à une cellule haploïde (23 chromosomes), et d'autre part le brassage génétique garantissant une identité génétique propre à la nouvelle cellule issue de la fécondation. De la fécondation à l'implantation, puis au développement précoce, l'embryon connaîtra un grand nombre de modifications biologiques. Toutefois, cette évolution pourra s'interrompre à tout moment. Chacune de ces étapes est primordiale et indispensable afin qu'une grossesse puisse atteindre son terme.

Ce chapitre, qui constitue un préalable à l'étude de la prise en charge du couple infertile, traitera des rappels à propos de la gamétogenèse, de l'anatomie des organes génitaux, et des différents étapes embryonnaires de la fécondation à l'implantation.

1. LA FEMME

1.1 L'appareil génital féminin

Il est le siège de la reproduction, c'est à dire qu'il assure la production des gamètes féminins, l'accueil et l'acheminement des spermatozoïdes, la fécondation de l'ovocyte, l'implantation et le développement de l'embryon (**figure 1**).

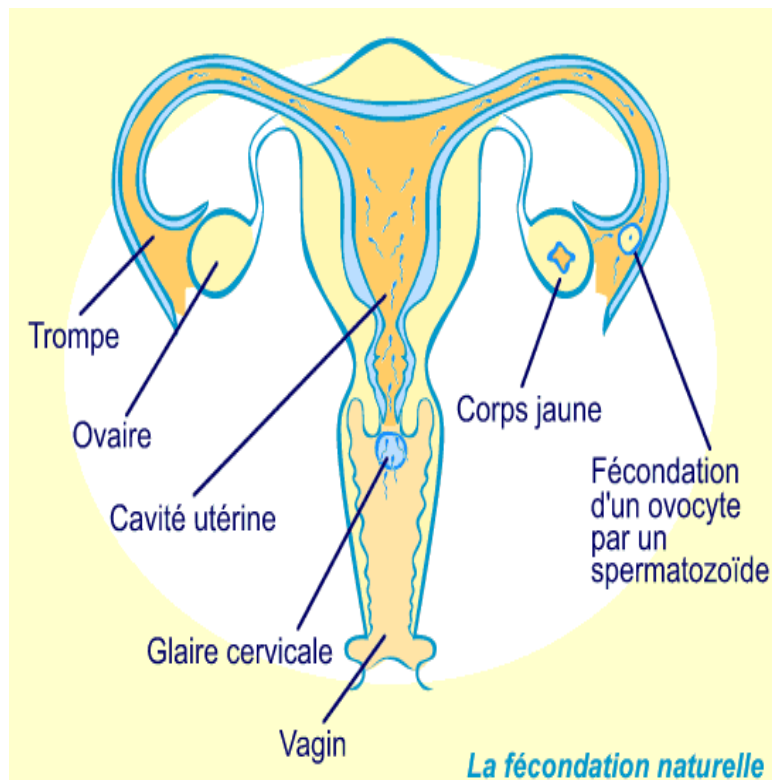


Figure 1 : coupe sagittale médiane de l'appareil génital féminin
 (www.cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/Genitalfeminin/textep1.html)

1.2 Ovogenèse et ovulation

L'ovogenèse (**figure 2**) se déroule au sein des follicules situés dans l'ovaire et débute lors de la vie embryonnaire, par mitoses successives de cellules appelées ovogonies. Au septième mois de vie fœtale, le stock d'ovogonies est d'environ sept millions. Les mitoses s'arrêtent alors et la première division de méiose démarre pour donner des ovocytes I (cellules diploïdes) à partir des ovogonies.

La méiose a pour fonction la production de cellules haploïdes à partir de cellules diploïdes, et le brassage génétique. Par exemple, les cellules humaines ont 23 paires de chromosomes homologues par cellule ($2n=46$). Les gamètes par contre, contiennent la moitié de ce nombre de chromosomes et sont dits haploïdes ($n=23$). C'est lors de la production des gamètes par le processus de méiose que le nombre de chromosomes est réduit. En effet, il est essentiel de réduire par moitié le nombre de chromosomes dans les gamètes puisque le matériel génétique de chacun ($n=23$) s'additionne pour produire un zygote ($n=46$). La méiose se fait en 2 étapes, la méiose I ou phase réductionnelle, et la méiose II ou phase équationnelle. Durant la méiose I, les chromosomes homologues sont séparés pour produire 2 cellules filles ayant la moitié des chromosomes et le brassage génétique s'opère. Ce sont des chromosomes dédoublés à 2 chromatides sœurs. Au cours de la méiose II, les chromatides sœurs se séparent pour produire 4 cellules filles haploïdes. A la naissance, la méiose se bloque en fin de prophase I, le nombre d'ovocytes I est alors d'environ 200 000. Celle-ci ne reprendra qu'au moment de la puberté. A partir de la puberté et jusqu'à la ménopause, tous

les 28 jours, la méiose reprend dans les follicules pré-ovulatoires. Cette phase concerne quelques 600 ovocytes I à chaque cycle. La première division de méiose se termine, la seconde commence et sera de nouveau bloquée jusqu'au stade de métaphase II. La méiose ne s'achèvera que si la fécondation a lieu.

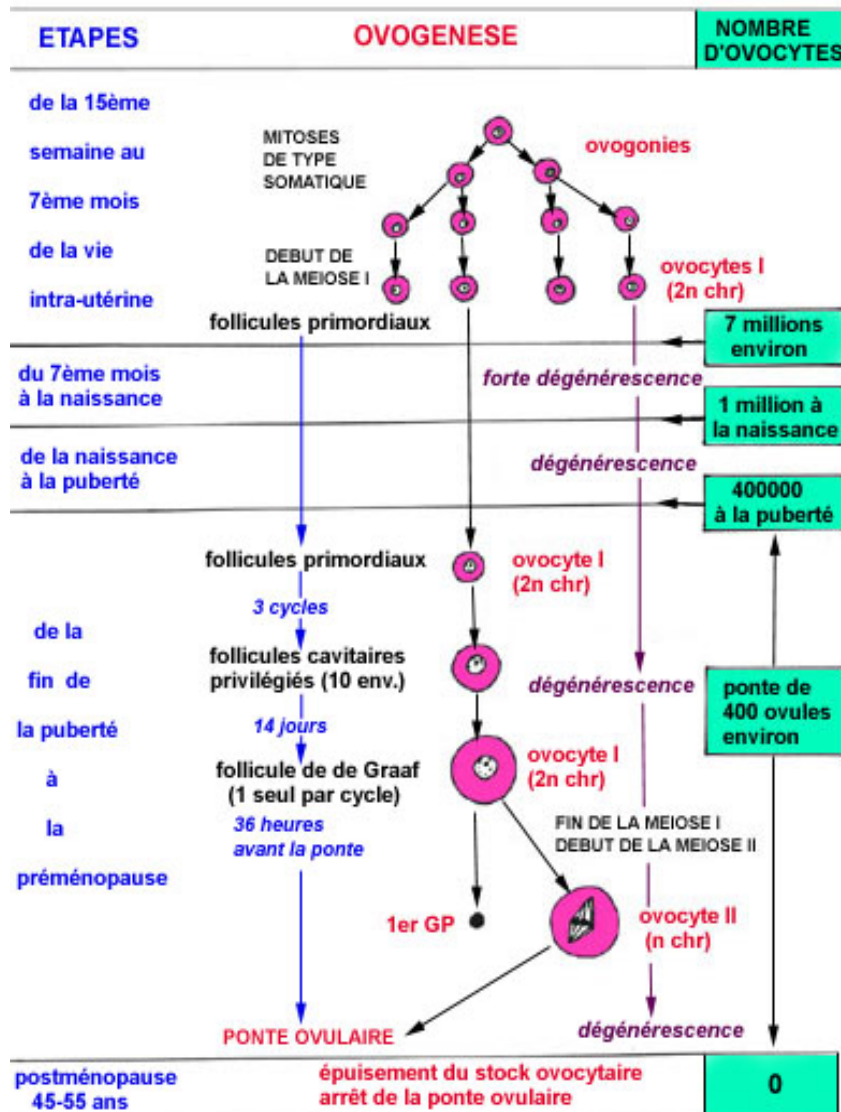


Figure 2 : Gamétogenèse chez la femme
 (www.cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/Genitalfeminin/textep1.html)

L'étude de l'ovogenèse ne peut pas être dissociée de celle de la maturation folliculaire. En effet, parallèlement à la reprise de la méiose à la puberté, dès l'installation des cycles hormonaux, les follicules vont subir différentes étapes de maturation. Il s'agit de la folliculogenèse (**figure 3**).

1.3 Follicules et folliculogenèse

Les follicules sont des formations sphériques situées à la périphérie des ovaires contenant les ovocytes. Ils sont formés de trois couches circulaires concentriques : la thèque externe, la thèque interne et la *granulosa* délimitant une cavité liquidienne ou *antrum*. La croissance des follicules est strictement parallèle à celle des ovocytes tant en terme de durée que de cinétique. A chaque nouveau cycle, les quelques follicules primordiaux recrutés (une dizaine) vont se développer en passant par trois stades successifs. Les follicules primaires, puis secondaires se caractérisant par la formation de la *granulosa*. A ce stade l'ovocyte I augmente de volume et s'entoure d'une enveloppe glycoprotéique, la zone pellucide. Les follicules tertiaires se définissent par l'apparition de cavités au sein de la *granulosa* et par la différenciation des thèques interne et externe. Les cavités confluent pour donner l'*antrum*, la taille du follicule augmente considérablement. Dans le follicule cavitaire l'*antrum* s'est agrandi, repoussant l'ovocyte I latéralement. Lorsque le follicule a atteint son volume maximum, au moment du pic ovulatoire, on parle de follicule de De Graaf. L'ovocyte I achève sa maturation en donnant l'ovocyte II et le premier globule polaire. Dans les quelques heures suivant le pic de LH (Luteinizing Hormon), la pression du liquide folliculaire augmente, la paroi folliculaire se rompt, libérant l'ovocyte II, capté par le pavillon de la trompe. Le follicule vidé de son contenu devient déhiscent, il est alors appelé corps jaune. Il s'agit de la phase lutéale, au cours de laquelle les cellules vont sécréter de la progestérone essentiellement, et des oestrogènes. En absence de fécondation le corps jaune dégénère en quelques jours.

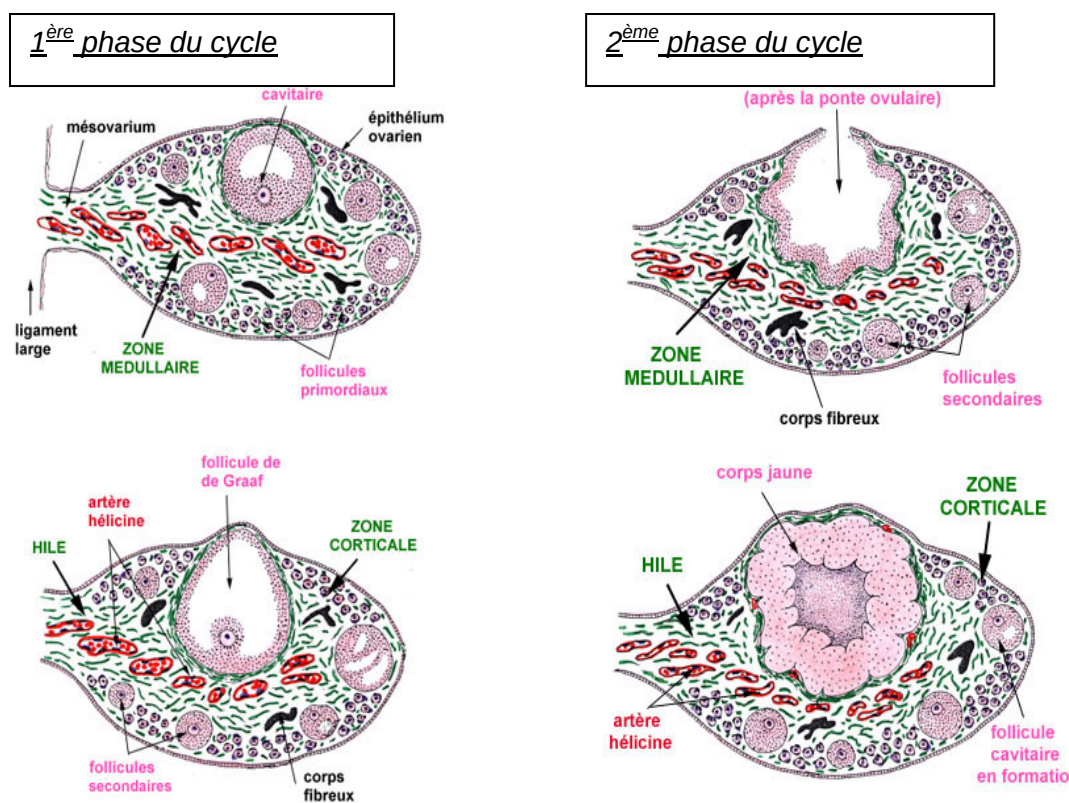


Figure 3 : L'ovaire aux différentes phases du cycle

1.4 Les sécrétions hormonales de l'ovaire

Le follicule, lors des 14 premiers jours du cycle synthétise des oestrogènes et plus particulièrement de l'œstradiol (**figure 4**). Cette synthèse augmente progressivement jusqu'à l'ovulation. Il s'agit de la phase folliculaire. Après l'ovulation, la synthèse d'œstradiol diminue et le corps jaune sécrète essentiellement de la progestérone. On appelle cette phase la phase lutéale. Le fonctionnement de l'ovaire étant cyclique, une nouvelle phase folliculaire succède à chaque phase lutéale. Le fonctionnement des ovaires est sous contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormon) stimule l'hypophyse, qui en réponse sécrète deux hormones, la FSH (Follicule Stimulating Hormon) et la LH (Luteinizing Hormon), agissant à leur tour sur les ovaires. Par un rétro-contrôle, les ovaires régulent le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire. En phase folliculaire, la FSH stimule la croissance des follicules et la synthèse d'œstradiol. En retour l'œstradiol régule la sécrétion de FSH. En fin de phase folliculaire, les fortes quantités d'œstradiol vont stimuler l'hypothalamus et l'hypophyse, entraînant une décharge brutale et très importante de LH (pic de LH). Elle induit l'ovulation et la maturation ovocytaire. En phase lutéale, la LH stimule le corps jaune sécrétant la progestérone. En fin de phase lutéale, la LH chute, entraînant la lutéolyse. S'il y a grossesse, l'embryon sécrète l'hCG (Chorionic Gonadotrophin) qui possède le même effet que la LH et va donc stimuler le corps jaune empêchant du même coup la lutéolyse. Par ailleurs, les hormones ovariennes sécrétées vont agir sur des organes cibles comme la glaire cervicale et l'endomètre.

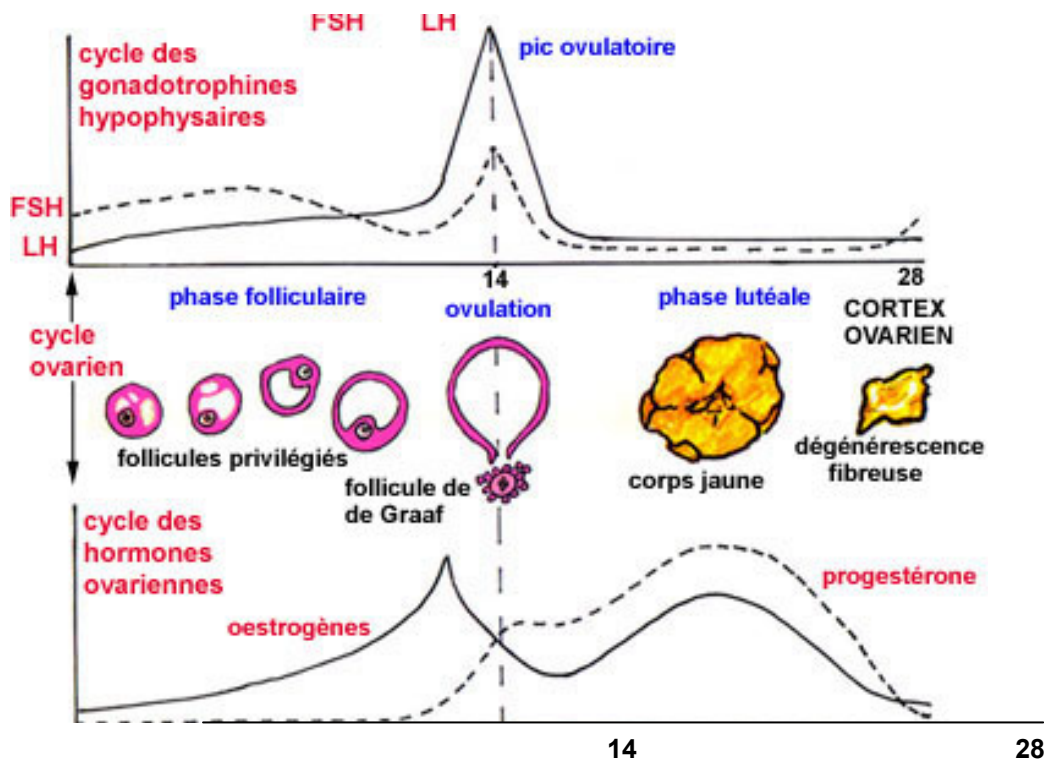


Figure 4: contrôle endocrinien de la fonction ovarienne.

2. L'HOMME

2.1 L'appareil génital masculin

Il assure la production des spermatozoïdes, leur transport et leur stockage dans les voies génitales masculines, et leur expulsion dans les voies génitales féminines lors de l'éjaculation (**figure 5**).

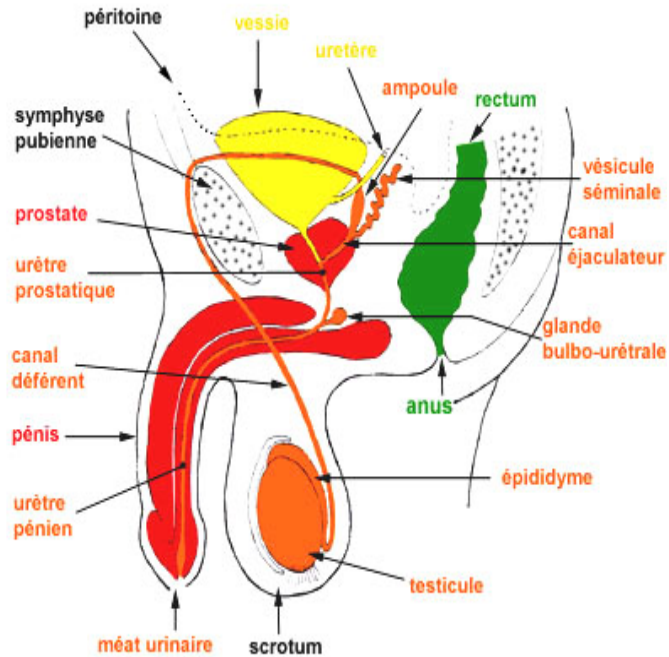


Figure 5 : :coupe sagittale médiane de l'appareil génital masculin
(www.cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/Genitalmasculin/textep1.html)

2.2 Le testicule

2.2.1 Morphologie

Le testicule est un organe pair. Il a la forme d'un ovoïde aplati transversalement, dont le grand axe est oblique en bas et en arrière. Il mesure, en moyenne, 4 à 5 cm de long, 2,5 cm d'épaisseur et pèse 20 grammes. Chaque testicule est logé dans une poche revêtue de peau, le scrotum. Il est coiffé par l'épididyme et suspendu dans le sac scrotal par le cordon spermatique qui contient le canal déférent, des vaisseaux sanguins et lymphatiques, et des fibres nerveuses. Il est fixé à la base du scrotum par le ligament scrotal.

2.2.2 Histologie

Chaque testicule est limité par l'albuginée, cloison conjonctive assez épaisse constituée principalement de fibres de collagènes (**figure 6**). Au pôle postéro-supérieur de l'organe, cette cloison s'épaissit pour former le corps de Highmore dont se détachent des travées qui s'enfoncent en éventail dans la profondeur de l'organe. Ces septa délimitent 200 à 300

lobules plus ou moins triangulaires. Chaque lobule contient quelques tubes dits séminifères ou séminipares, très longs (pouvant atteindre un mètre), et très pelotonnés. Ces tubes, d'un diamètre d'environ 200 micromètres ont une paroi épaisse, principalement constituée de 4 à 8 couches de cellules germinales évoluant depuis la périphérie du tube vers la lumière tout en se divisant et se différenciant jusqu'à formation des spermatozoïdes.

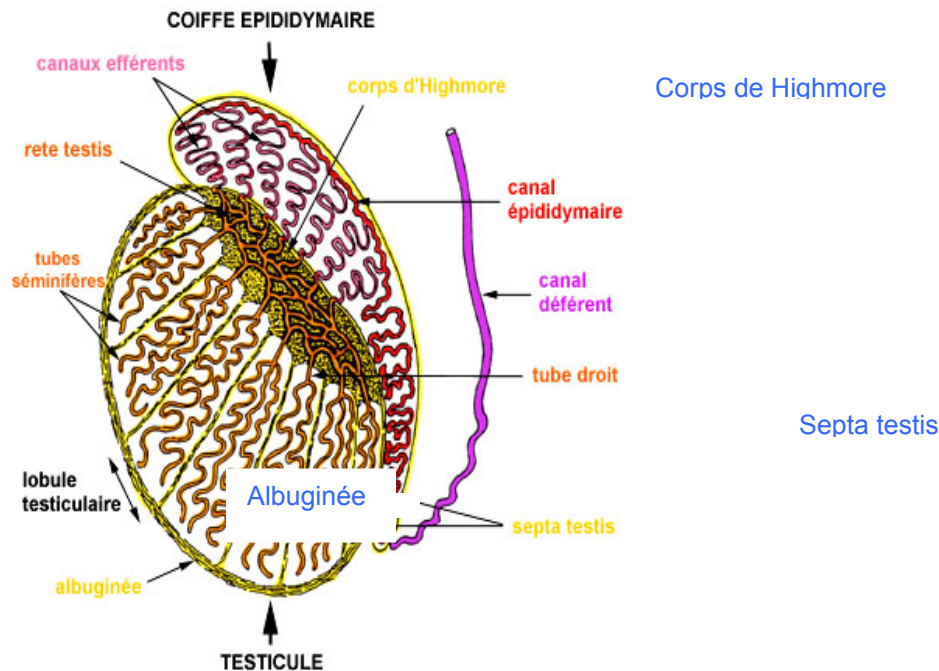


Figure 6 : Structure générale du testicule

([www.cri-cirs-wnts.univ-](http://www.cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/Genitalmasculin/textep1.html)

[lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/Genitalmasculin/textep1.html](http://www.cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/Genitalmasculin/textep1.html))

Les espaces entre les tubes sont occupés par un tissu interstitiel conjonctif lâche, riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques et en fibres nerveuses, et contenant des cellules endocrines : les cellules de Leydig. Les cellules de Leydig sont responsables de la production de testostérone, dès lors elles possèdent l'ultrastructure des cellules synthétisant des stéroïdes : gouttelettes intracytoplasmiques de cholestérol, réticulum endoplasmique lisse, mitochondries. Par ailleurs, la paroi des tubes séminifères contient des cellules à la structure et aux fonctions complexes : les cellules de Sertoli (**figure 7**). Les cellules de Sertoli créent un véritable microenvironnement indispensable aux divisions et différenciations des cellules germinales, notamment grâce à la synthèse de cytokines. Elles ont également pour rôle de phagocyter à leur pôle apical les fragments de cytoplasme perdus par les spermatozoïdes au cours de leur maturation. Les tubes séminifères se prolongent par de petits tubes courts et rectilignes appelés tubes droits, pénétrant ensuite dans le corps de Highmore, où ils s'anastomosent pour former un réseau : le *rete testis*. S'en détachent une quinzaine de tubes, les cônes efférents, qui perforent l'albuginée pour rejoindre l'épididyme.

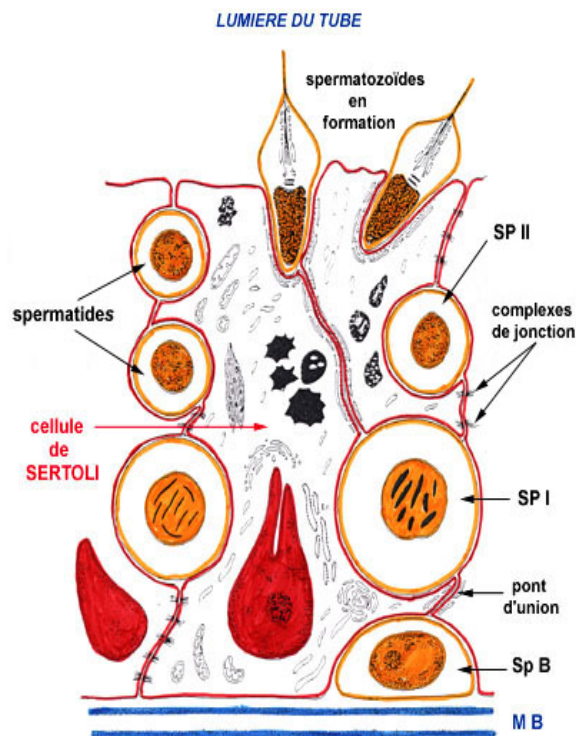


Figure 7 : maturation des cellules germinales au sein des tubes séminifères
 (www.cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/Genitalmasculin/textep1.html)

2.2.3 Vascularisation

Les testicules sont vascularisés par les artères spermatiques internes qui au niveau du corps de Highmore se subdivisent en artères interlobulaires donnant des capillaires interlobulaires et périlobulaires. Le réseau veineux de retour se connecte à celui de l'albuginée et constitue le réseau pampiniforme entourant les tubes efférents. Le réseau veineux du testicule droit rejoint la veine cave, le gauche la veine rénale gauche. Ce dernier est davantage sujet à des dilatations variqueuses (varicocèle). Le réseau artériel traverse le réseau pampiniforme où a lieu un échange thermique, refroidissant le sang artériel. Le drainage lymphatique est important car il collecte une partie de la testostérone produite par les cellules de Leydig.

2.3 Spermatogenèse

On appelle spermatogenèse l'ensemble des processus, qui à partir de la puberté aboutissent à la formation des spermatozoïdes à partir des cellules germinales appelées spermatogonies (**figure 8**).

La spermatogenèse peut être caractérisée en 3 étapes : la division des spermatogonies, les divisions méiotiques et la spermiogenèse.

Les spermatogonies, cellules souches diploïdes arrondies, localisées en périphérie des tubes séminifères, vont se diviser par mitoses successives. Elles sont de 3 types, les spermatogonies de type Ad, non différenciées, qui constituent un stock de cellules séminales de réserve, les spermatogonies de type Ap issues des premières, et les spermatogonies de type B à l'origine de la lignée germinale. En effet, ces spermatogonies B vont, à l'occasion

des 2 divisions méiotiques, donner les spermatocytes I (ou de premier ordre), les spermatocytes II (ou de second ordre) et les spermatides. C'est au cours de la première mitose de la méiose que s'effectue le brassage génétique et la ségrégation des chromosomes sexuels permettant le passage de la diploïdie à l'haploïdie. Ainsi, le spermatocyte primaire contenant 46 chromosomes à 2 chromatides, après la première division méiotique, donne naissance à 2 spermatocytes secondaires contenant 23 chromosomes à 2 chromatides. La seconde division méiotique sépare les chromatides et aboutit à la formation de spermatides haploïdes (23 chromosomes). Les spermatides vont ensuite se différencier en spermatozoïdes au cours du processus de la spermiogenèse. La chromatine du noyau se condense tandis qu'une volumineuse vésicule d'origine golgienne, l'acrosome, se forme pour venir coiffer une bonne partie du noyau et constituer avec celui-ci la tête du spermatozoïde. L'acrosome contient un grand nombre d'enzymes lytiques. Se développe par ailleurs un long flagelle séparé de la tête par une pièce intermédiaire contenant surtout des mitochondries. Ils n'acquièrent cependant pas leur complète maturité fonctionnelle dans les tubes séminifères. C'est au cours de leur trajet dans les voies excrétrices extratesticulaires qu'ils acquièrent la motilité nécessaire pour exercer leur action fécondante.

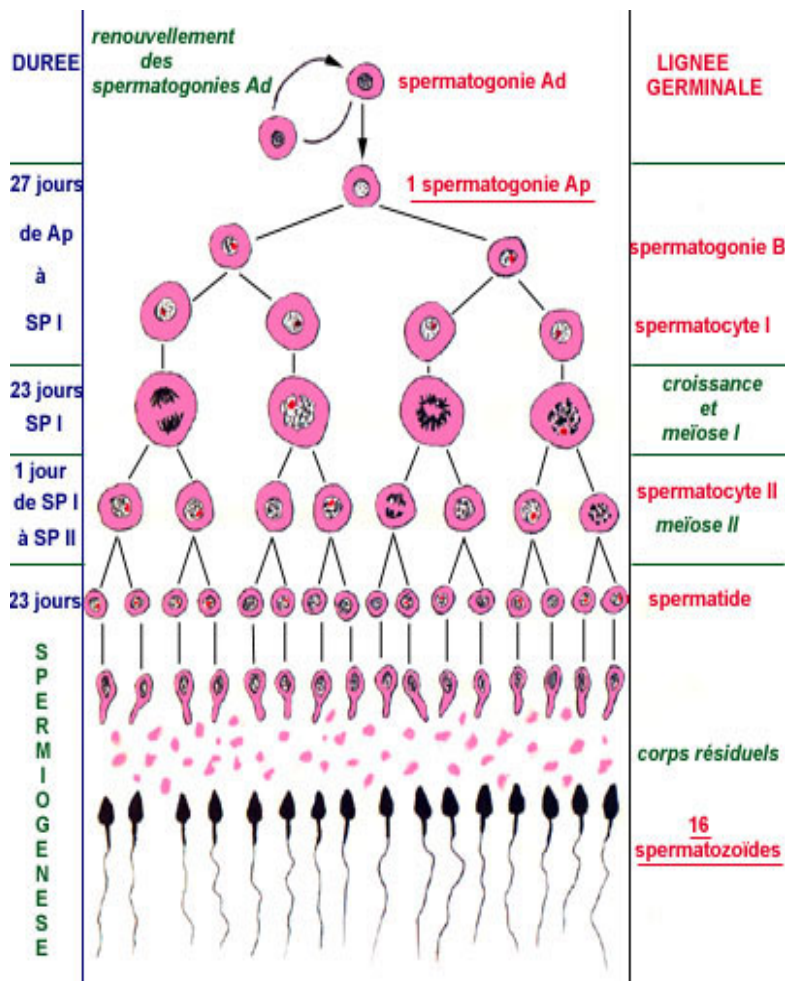


Figure 8 : Spermatogenèse

([www.cri-cirs-wnts.univ-](http://www.cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/Genitalmasculin/textep1.html)

[lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/Genitalmasculin/textep1.html](http://www.cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/Genitalmasculin/textep1.html))

La spermatogenèse normale aboutit à une production d'environ 100 millions de spermatozoïdes par millilitre de sperme, ce qui est loin du chiffre théorique calculé compte tenu du nombre de spermatogonies qui entrent régulièrement en division. Cette différence

s'explique par le fait que près de la moitié des cellules dégénèrent dans la paroi des tubes séminifères avant d'atteindre leur maturité. L'apoptose joue un rôle clé dans l'élimination des cellules germinales avec des anomalies chromosomiques. On désigne par le terme d'apoptose la mort génétiquement programmée d'une cellule. Au cours de la spermatogenèse, l'apoptose permet d'éliminer les cellules pour lesquelles la réparation de l'ADN est défectueuse ou dépassée. Elle est un filtre à la transmission de tares génétiques. Elle permet ainsi d'éliminer les cellules germinales avec des lésions de structure de leur ADN (anomalies chromosomiques, recombinaisons génétiques aberrantes), mais aussi les cellules endommagées par un stress environnemental (chaleur), par des radiations ionisantes, par la déplétion de facteurs trophiques (hormones, facteurs de croissance). Elle permet également l'ajustement du nombre de cellules germinales par rapport au nombre de cellules de Sertoli (constant), car les cellules mal positionnées pourraient ne pas percevoir les messages nécessaires à leur survie. La spermatogenèse ne peut se produire qu'à une température bien précise, légèrement inférieure à celle du corps. C'est la raison pour laquelle les testicules se situent en dehors de l'abdomen. Lorsque la descente testiculaire dans les bourses n'a pas lieu (cryptorchidie) la maturation des spermatogonies ne peut avoir lieu. Les cellules germinales (cellules en division) sont sensibles à de nombreux agents toxiques (alcool, nicotine...), aux radiations ionisantes type rayons X ou γ , aux infections, aux carences alimentaires... Les spermatozoïdes morphologiquement mûrs mais non fonctionnels sont acheminés par des tubes excréteurs intratesticulaires d'abord, extratesticulaires ensuite. Ils y sont mêlés au liquide séminal. Les voies excrétrices extratesticulaires comprennent les canaux efférents, l'épididyme, le canal déférent et l'urètre. Les canaux efférents comportent une petite portion intratesticulaire et une autre (cône) extratesticulaire. Les cônes sont constitués de deux types cellulaires de hauteur différente, les cellules les plus hautes possèdent des cils vibratiles qui assurent la progression des spermatozoïdes, les courtes sont des cellules glandulaires. L'épididyme est constitué d'un long canal de 5 à 6 mètres. Les canaux efférents via les cônes efférents se jettent dans sa première partie, la plus volumineuse, appelée tête de l'épididyme. Ses fonctions sont le transport des spermatozoïdes via le péristaltisme de la paroi du canal et la pression du fluide épидидymaire, et leur stockage. La durée du trajet des spermatozoïdes le long de l'épididyme est d'environ dix jours. Au cours du transit épидидymaire, le spermatozoïde acquiert son pouvoir fécondant, qui consiste en l'acquisition de la mobilité et la transformation de sa membrane de sorte qu'il puisse reconnaître la zone pellucide et fusionner avec la membrane plasmique ovocytaire. L'autre événement contemporain de l'acquisition du pouvoir fécondant est la condensation de la chromatine. Il s'agit d'un événement majeur car des défauts de condensation de la chromatine peuvent s'accompagner de lésions au sein de l'ADN du spermatozoïde. Or nous accordons beaucoup d'importance dans ce travail à la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Le canal déférent est un tube plus ou moins rectiligne, long de 45 centimètres et de 2 millimètres de diamètre, reliant la queue de l'épididyme à l'urètre prostatique. Sa portion intraprostatique porte le nom de canal éjaculateur. Sa paroi, très épaisse et composée de muscles lisses, joue un rôle important dans la propulsion des spermatozoïdes au moment de l'éjaculation. Les sécrétions constituant la partie liquidienne du sperme proviennent surtout des vésicules séminales et de la prostate. Le liquide de la vésicule séminale représente environ 70% du volume du liquide alcalin spermatique. Il contient notamment des globulines, du fructose, de la vitamine C et des prostaglandines. Lors de l'éjaculation, les protéines produites coagulent, ce qui confère au sperme sa viscosité. La prostate, de la taille d'une châtaigne, est constituée de tissu glandulaire et fibro-musculaire. Elle forme un manchon autour de l'urètre prostatique. Les glandes prostatiques, au nombre d'une cinquantaine, synthétisent le liquide prostatique sous l'influence de la testostérone. Il s'ajoute au liquide séminal pour assurer notamment la survie des spermatozoïdes. Il est riche en protéines, enzymes protéolytiques, acide citrique, zinc et magnésium.

2.4 Régulation de la fonction testiculaire

La spermatogénèse est sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire (**figure 9**). En période pubertaire, la production de GnRH libérée de façon pulsatile au niveau hypothalamique, augmente fortement. Elle est à l'origine de l'apparition des caractères sexuels secondaires. La GnRH provoque la sécrétion hypophysaire, elle-même pulsatile, de deux hormones, la FSH et la LH. La LH se fixe sur des récepteurs membranaires des cellules de Leydig, stimulant ainsi la stéroïdogénèse. Une partie de la testostérone sécrétée pénètre dans le cytoplasme sertolien, où elle se lie à l'ABP pour agir sur l'évolution des cellules germinales. La testostérone libre passe dans le sang pour exercer deux actions : une action positive sur le tractus génital et les glandes annexes, une rétro-action négative sur la sécrétion de LH, soit indirectement sur les neurones hypothalamiques, soit directement sur les cellules gonadotropes hypophysaires. La FSH se fixe sur des récepteurs membranaires des cellules de Sertoli. Elle active la spermatogénèse, elle stimule la formation d'ABP et provoque la sécrétion d'inhibine, hormone exerçant un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH, soit indirectement sur les neurones hypothalamiques en diminuant la sécrétion de la GnRH, soit directement sur les cellules gonadotropes hypophysaires.

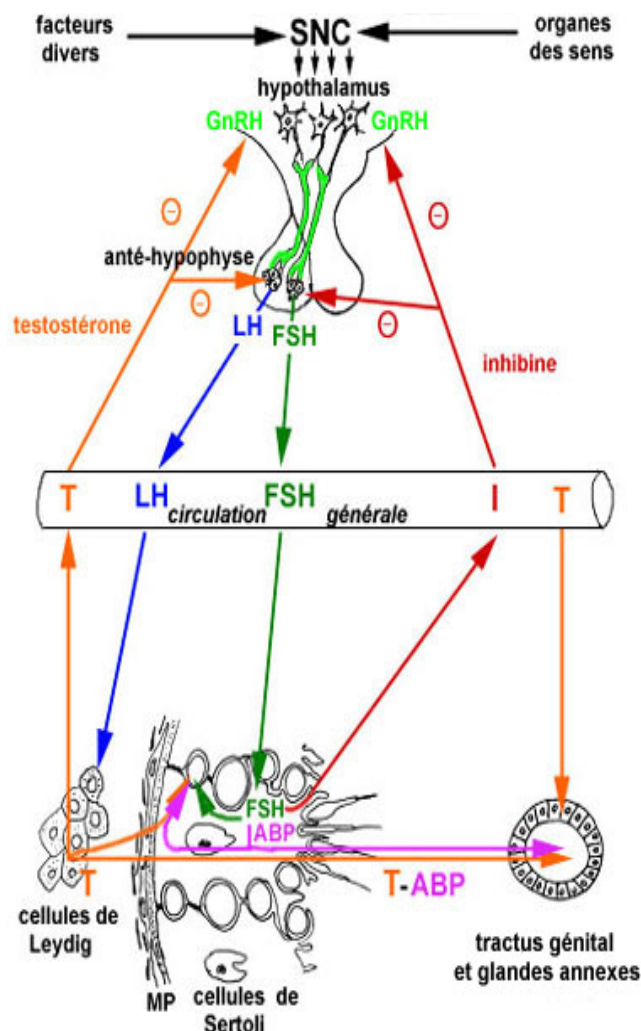


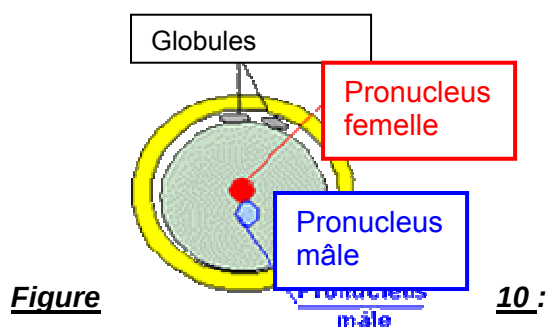
Figure 9 : contrôle neuro-endocrinien de l'appareil génital masculin
 (www.cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/Genitalmasculin/textep1.html)

3.LA FÉCONDATION *IN VIVO*

Lors d'un rapport sexuel, des millions des spermatozoïdes sont éjaculés dans la cavité vaginale. Pour atteindre l'ovocyte et le féconder, ils vont devoir migrer vers les trompes. Pour cela ils doivent d'abord franchir la glaire cervicale. La glaire cervicale, sécrétée par les glandes endocervicales du col de l'utérus, forme un réseau de mailles ressemblant à un filet. Sa structure tridimensionnelle varie en fonction du cycle. En période ovulatoire, la structure de ce réseau est optimale au franchissement des spermatozoïdes à l'intérieur de la cavité utérine. Les spermatozoïdes se fauflent à travers ces mailles pour atteindre l'utérus puis les trompes grâce à leur mobilité flagellaire. La traversée de la glaire joue un rôle essentiel dans les processus de fécondation. En effet, la glaire constitue un milieu favorable pour la survie des spermatozoïdes contrairement au milieu vaginal très acide. Par ailleurs, elle joue le rôle de filtre, c'est à dire que seuls les spermatozoïdes normaux et suffisamment mobiles la franchissent. Enfin, les spermatozoïdes ne peuvent acquérir leur pouvoir fécondant qu'après traversée de la glaire par un processus appelé capacitation. Au cours de la capacitation, les facteurs décapacitants déposés au cours du transit épидидymaire sont éliminés, et il s'opère des modifications au sein de la membrane du spermatozoïde. La perméabilité membranaire au calcium et à l'oxygène est favorisée, activant leur mobilité. Au terme de la traversée de l'utérus et des trompes, seuls quelques centaines de spermatozoïdes atteignent l'ampoule tubaire, lieu de la fécondation.

Pour introduire son noyau à l'intérieur de l'ovocyte, le spermatozoïde doit auparavant traverser le *cumulus oophorus* et atteindre la zone pellucide. Il s'y fixe puis traverse cette zone grâce aux enzymes (hyaluronidase, estérase) contenues dans l'acrosome. Les membranes des deux gamètes fusionnent, la totalité du spermatozoïde pénètre à l'intérieur de l'ovocyte. Ce dernier, par une réaction chimique, que l'on nomme réaction corticale, modifie sa zone pellucide de sorte qu'elle ne soit plus traversée par aucun autre spermatozoïde.

Après la fécondation, l'ovocyte termine sa méiose et expulse un deuxième globule polaire. L'ovocyte contient alors deux noyaux (*pronuclei*), et est appelé zygote (**figure 10**).



([www.ulg.ac.be/histohum/cours/Module-](http://www.ulg.ac.be/histohum/cours/Module-reproducteur.pdf)

[reproducteur.pdf](http://www.ulg.ac.be/histohum/cours/Module-reproducteur.pdf))

Ce zygote se divise pour donner naissance à un embryon à 2 cellules identiques. Lors de cette division cellulaire, les deux *pronuclei* se rapprochent, mélangeant ainsi les chromosomes maternels et paternels pour former le génome embryonnaire.

Les cellules embryonnaires se divisent au rythme d'environ une division toutes les dix heures. Au stade 16 cellules (J3) on parle de *morula* (petite mûre).

A 64 cellules (J4-J5) une cavité liquidienne se creuse au sein de l'embryon, alors appelé blastocyste. A partir de ce stade, l'embryon grossit, sort de la zone pellucide (J5-J6), c'est l'éclosion du blastocyste.

Au cours de son développement, l'embryon se déplace dans la trompe pour se diriger vers l'utérus. Ce déplacement s'effectue grâce aux cils tapissant la paroi de la trompe et au péristaltisme de la paroi tubaire. L'embryon atteint l'utérus vers le quatrième jour après la fécondation.

Après son éclosion, le blastocyste peut se fixer sur l'endomètre et pénétrer celui-ci. Il s'enfouit à l'intérieur de la muqueuse, c'est la nidation (J8-J9) au cours de laquelle l'embryon se connecte aux vaisseaux sanguins de l'utérus.

CHAPITRE 3 APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE DE L'INFERTILITE

Si les problèmes de reproduction existent depuis l'origine de l'espèce, la demande d'aide médicale des couples et les possibilités thérapeutiques offertes n'ont fait que s'accroître au fil du temps.

Pour appréhender au mieux un problème d'hypofécondité, il est important de maîtriser les données épidémiologiques de l'infertilité et de bien conduire un bilan d'exploration du couple. Une enquête a été menée au sein du Service de Médecine du Développement et de la Reproduction du CHU de Nantes. Elle s'est intéressée aux facteurs environnementaux et au mode de vie de la population masculine consultant pour infertilité.

Dans ce troisième chapitre, après quelques rappels épidémiologiques à propos de l'infertilité du couple puis de l'homme, et ses moyens d'exploration, nous discuterons les résultats de l'enquête réalisée et les perspectives qu'ils offrent.

1.DÉFINITIONS ET RAPPELS ÉPIDÉMIOLOGIQUES DE L'INFERTILITÉ

Dans les pays anglo-saxons, la terminologie est simple pour désigner un désir de procréation insatisfait : « infertility », et « sterility » si ce désir de procréation ne peut définitivement pas être satisfait.

En France, la richesse de notre vocabulaire met à notre disposition plusieurs termes, trop souvent employés à tort. C'est pourquoi il est important de maîtriser leur définition afin d'appréhender correctement la situation.

1.1 La fécondité

La fécondité est un état, celui d'avoir procréé. L'infécondité traduit l'absence d'enfant au sein d'un couple à un moment donné.

L'infécondité peut être primaire si aucune grossesse n'a jamais démarré ; elle est secondaire si une grossesse évolutive a permis la naissance d'au moins un enfant ; elle est primo-secondaire si une grossesse évolutive ou non est intervenue mais pas parvenue à terme (fausse couche, grossesse extra-utérine, interruption de grossesse).

1.2 La fertilité

La fertilité est une potentialité, c'est à dire la capacité pour un couple de concevoir un enfant. L'infertilité est caractérisée par difficulté à concevoir. L'OMS considère comme couple infertile celui qui après deux ans de relations sexuelles sans contraception n'a pas procréé.

1.3 La stérilité

La stérilité correspond, au sens strict du terme, à une situation définitive et irréversible : l'absence totale de possibilité de procréation. Les situations de stérilité absolue sont rares.

1.4 Mesures de l'infertilité

On dispose de deux indices de mesure de la fertilité.

1.4.1 Le délai nécessaire à concevoir (DNC)

Le DNC correspond au nombre de cycles d'exposition nécessaires à obtenir une grossesse. A 25 ans, on considère que le DNC est de 4 cycles, pour tous les âges confondus il est de 5 cycles.

Lorsque ce délai devient supérieur à 2 ans, des explorations peuvent être envisagées.

1.4.2 La fécondabilité

La fécondabilité ou probabilité de conception à chaque cycle exposé à la grossesse est exprimée en pourcentage. C'est le pourcentage de grossesse par cycle d'exposition à la grossesse. A 25 ans, la moyenne de fécondabilité est estimée à 25%, cela signifie qu'à chaque cycle d'exposition à la grossesse, il existe 25% de chance de survenue d'une grossesse. Tous âges confondus, la fécondabilité est de 20%. Le raisonnement se fait pour des périodes de 12 cycles. Après un an, 93% des couples ont conçu. Parallèlement, la fécondabilité des couples n'ayant pas encore conçu diminue avec le temps, car les couples les plus fertiles disparaissent rapidement de la cohorte. Au fur et à mesure, la fécondabilité des couples s'amointrit, après 1 an d'infécondité, elle est de 12%, après 2 ans de 7.9% et après 5 ans elle chute à 4%. Ces données permettent de comprendre combien il est important d'envisager une prise en charge médicale après 2 ans d'infécondité. Toutefois, un tel délai sera à évaluer en fonction de l'âge de la patiente.

2.BILAN D'INFERTILITÉ MASCULINE

La première consultation avec le couple est un moment essentiel pour l'approche étiologique et la prise en charge de l'infertilité. Elle doit mettre le couple en confiance, la présence des deux conjoints est fortement souhaitée. Au cours de l'entretien, un interrogatoire le plus exhaustif possible est réalisé. Le médecin fera des rappels sur les différentes étapes de la physiologie de la reproduction et envisagera avec le couple les différentes perspectives s'offrant à lui, qu'elles soient médicales ou non.

2.1 Eléments de l'interrogatoire

2.1.1 Données communes au couple

La durée de vie commune et surtout la durée réelle d'exposition à la grossesse sont des éléments importants. Le médecin précisera avec le couple s'il s'agit d'une infécondité primaire, secondaire ou primo-secondaire. Il renseignera également les professions de chacun des conjoints et la fréquence des absences professionnelles éventuelles.

L'interrogatoire de la femme ne sera pas détaillé ci-après, notre travail se rapportant essentiellement à l'homme.

2.1.2 Interrogatoire de l'homme

2.1.2.1 L'âge

Après 45 ans, il existe une diminution de la qualité du *conceptus* et une augmentation du nombre de fausses couches. Cette notion d'âge était jusqu'alors essentiellement attribuée à la femme, mais la femme n'est pas la seule à dépendre du temps qui passe. Dans une étude chinoise de 2002, Jiao Z. et son équipe ont montré que la fécondabilité est significativement réduite lorsque l'homme dépasse les 40 ans (Jiao et *al.*, 2002).

2.1.2.2 Les antécédents médicaux

Le médecin interrogera l'homme sur le déroulement de sa puberté, l'existence de pathologies, infectieuses (oreillons à la puberté avec orchite, urétrite, prostatite), générales (diabète compliqué pouvant être à l'origine d'éjaculation rétrograde). Il notera si l'homme prend des médicaments pouvant retentir sur la qualité du sperme et la libido (anti-hypertenseurs, hypo-lipémiants...). En cas d'antécédents carcinologiques, on demandera le protocole exact de traitement et bien sûr si une conservation du sperme a pu être réalisée avant chimiothérapie ou radiothérapie. Il faut savoir qu'une dose unique générale de 80 Grays entraîne une azoospermie irréversible et de façon quasi constante.

2.1.2.3 Les antécédents chirurgicaux

Le médecin cherchera à répertorier les interventions au niveau uro-génital pouvant avoir des répercussions sur les fonctions testiculaires. Il recherchera donc une cryptorchidie, une torsion testiculaire, un traumatisme testiculaire, un traitement chirurgical d'une hernie inguinale ou du col vésical.

2.2 Examen clinique de l'homme

L'examen clinique de l'homme consiste en un examen urologique. Le médecin examinera la verge, les testicules (leur taille, leur situation), l'épididyme de la tête à la queue, les déférents.

Il recherchera l'existence d'une cicatrice (témoin d'une chirurgie, d'une biopsie), d'un varicocèle uni ou bilatérale en palpant le cordon spermatique chez le sujet debout. Eventuellement, un toucher rectal pourra compléter l'examen, il apprécie la prostate et les vésicules séminales. Le médecin notera également la pilosité axillaire et pubienne (testostérone), recherchera une gynécomastie (hyperprolactinémie).

2.3 Bilan biologique masculin

2.3.1 Analyse spermiologique

2.3.1.1 Spermogramme et spermocytogramme

C'est l'examen de base du bilan masculin. Il doit être réalisé après 3 à 5 jours d'abstinence, un tel délai étant nécessaire pour une standardisation optimale des résultats. Le recueil s'effectue par masturbation (rarement par vibromassage), au laboratoire afin de respecter les conditions d'asepsie. Dans quelques situations exceptionnelles, le recueil est autorisé à domicile. Dans ce cas, le patient devra remplir un document garantissant l'identité de la personne à l'origine du prélèvement.

2.3.1.1.1 Spermogramme

Le prélèvement est étudié après liquéfaction 15 à 30 minutes à 37°C (dans une étuve). Les paramètres suivants sont appréciés :

- le volume de sperme.

Il doit être compris entre 2 et 6 mL. Un volume inférieur à 2 mL définira une hypospermie, un volume supérieur à 10 mL définira une hyperspermie. Dans ce dernier cas, une lésion des glandes annexes sera évoquée.

- le pH.

Il doit être compris entre 7.2 et 8. Il est le témoin indirect des sécrétions des glandes annexes. Un pH inférieur à 6.5 peut orienter vers un défaut de fonctionnement des vésicules séminales, un pH supérieur à 8 évoquera des séquelles prostatiques.

- la viscosité.

Elle est évaluée d'après l'écoulement à la pipette. Elle a peu d'intérêt pour l'interprétation du bilan mais peut rendre difficile la lecture de la mobilité et la numération.

- la vitalité.

Elle est évaluée en utilisant un colorant vital (éosine-nigrosine), colorant les spermatozoïdes morts. Elle est réalisée si la mobilité est inférieure à 30%. Elle doit être supérieure à 75%.

Une vitalité diminuée, définira la nécropermie.

Les paramètres suivants sont mesurés :

- la numération des spermatozoïdes.

Elle doit être comprise entre 20 et 100 millions de spermatozoïdes/mL. L'oligospermie est définie par une numération des spermatozoïdes inférieure à 20 millions par millilitre. La numération n'est pas un facteur prédictif essentiel du pouvoir fécondant. En effet, jusqu'à 5-10 millions/mL, si la mobilité est satisfaisante, les conséquences sur l'aptitude fonctionnelle sont minimales. En dessous de 5 millions/mL, l'hypofertilité est fréquente. Si aucun spermatozoïde n'est retrouvé, on demandera un prélèvement de contrôle. Le terme d'azoospermie ne sera employé que si elle est confirmée sur 2 prélèvements à distance. Il existe 2 types d'azoospermie : l'azoospermie sécrétoire et l'azoospermie excrétoire.

L'azoospermie sécrétoire est un arrêt de production des spermatozoïdes. Elle peut être due soit à une atteinte testiculaire d'origine exogène, soit par atteinte d'origine génétique. Les atteintes testiculaires exogènes comprennent les orchites et épididymorchites virales ou bactériennes (entérobactéries, chlamydiae, mycoplasme, gonocoque), la varicocèle (élargissement veineux au niveau du pampiniforme du cordon spermatique), la torsion testiculaire qui conduit à une azoospermie définitive si elle dépasse une dizaine d'heures. Les atteintes d'origine génétique comprennent les anomalies du nombre de chromosomes, comme le syndrome de Klinefelter (47,XXY), et les anomalies de structure des chromosomes, pouvant porter sur les chromosomes sexuels (microdélétion du Y), ou sur les autosomes (mucoviscidose). L'azoospermie excrétoire s'observe lorsqu'un des canaux d'excrétion (urètre, épididyme, canal déférent) est obstrué, tandis que les testicules sont fonctionnels. Elle est soit d'origine congénitale, soit secondaire à une infection sexuellement transmissible, ou à un traumatisme. Les troubles de l'éjaculation comme l'éjaculation rétrograde peuvent également être à l'origine d'azoospermie. Dans ce dernier cas, les spermatozoïdes sont retrouvés dans l'urine. Ces troubles sont liés à des maladies neurologiques, souvent dues à des complications du diabète. La polyspermie (numération supérieure à 100 millions/mL) est peu significative pour le bilan. Lors de la numération on évaluera également la proportion de cellules germinales par rapport aux spermatozoïdes totaux (<10%), et le taux de leucocytes (< 100000/mL).

- la mobilité.

Elle est mesurée à la 1^{ère} et à la 4^{ème} heure après éjaculation. Elle distingue 4 classes de spermatozoïdes : les mobiles progressifs rapides, lents, les mobiles sur place et les immobiles. L'asthénospermie est un défaut de mobilité des spermatozoïdes, le seuil défini est de 50% de spermatozoïdes mobiles totaux à la première heure dont au moins 25% de mobiles progressifs. Lorsque la mobilité chute de plus de 50% à la 4^{ème} heure, par rapport à la mobilité initiale, on parle d'asthénospermie secondaire. La mobilité est un paramètre

pronostic important du pouvoir fécondant du sperme. Les chances de grossesse sont d'autant plus élevées que le nombre de spermatozoïdes mobiles est important.

- les caractéristiques de mouvement.

Elles sont corrélées à la pénétration du mucus cervical et sont mesurées par un automate de microvidéographie. Les paramètres renseignés sont :

- la VSL (Velocity Straight Line), ou vitesse progressive du spermatozoïde exprimée en $\mu\text{m}/\text{sec}$

- la VCL (Velocity Curved Line), ou vitesse curvilinéaire exprimée en $\mu\text{m}/\text{sec}$

- l'ALH (Lateral Amplitude of Head), ou amplitude latérale de battement de la tête exprimée en μm .

Il peut y avoir des troubles du mouvement des spermatozoïdes (vitesse, amplitude latérale du mouvement de la tête, trajectoire). Ces anomalies peuvent être dues à des malformations des spermatozoïdes ou à des infections microbiennes. La présence d'anticorps dirigés contre les spermatozoïdes, produits au cours de certaines pathologies autoimmunes, peut également diminuer les capacités de mouvement en créant un encombrement. Ainsi, une mobilité initiale quasiment nulle, avec présence d'agglutinats, doit faire rechercher des anticorps anti-spermatozoïdes. Les anticorps de type IgG ont un effet cytotoxique, les IgA possèdent surtout un pouvoir agglutinant et sont rarement présents sans IgG, mais ont le rôle le plus important dans l'infertilité masculine. La détection des IgG et IgA se fait par le MAR-test, qui est un test d'agglutination de particules de latex sensibilisées.

2.3.1.1.2 Le spermocytogramme

La morphologie des spermatozoïdes est étudiée au microscope optique après fixation et coloration de Papanicolaou d'un frottis de sperme (**figure 11**). La tératospermie est définie par un taux élevé de formes anormales (plus de 70% des formes observées). Ces anomalies pouvant porter soit sur la tête, le flagelle, la pièce intermédiaire, plusieurs anomalies pouvant être combinées. Un sperme normal doit comprendre plus de 30% de formes normales. Les anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle sont répertoriées selon la classification de David qui distingue 7 anomalies de la tête, 3 de la pièce intermédiaire, 5 du flagelle.

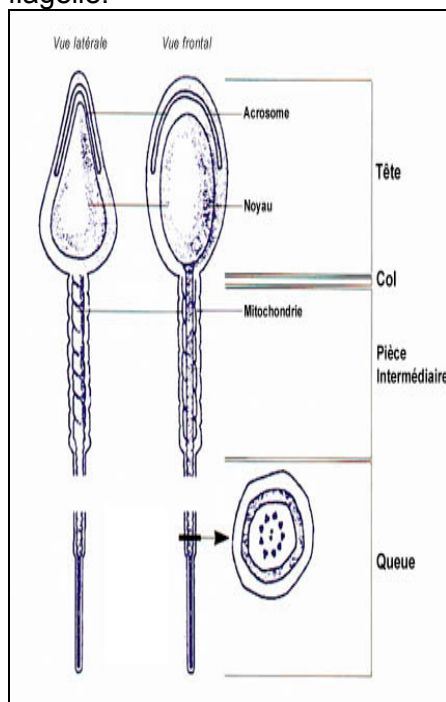


Figure 11 : schéma d'une coupe longitudinale d'un spermatozoïde de morphologie normale

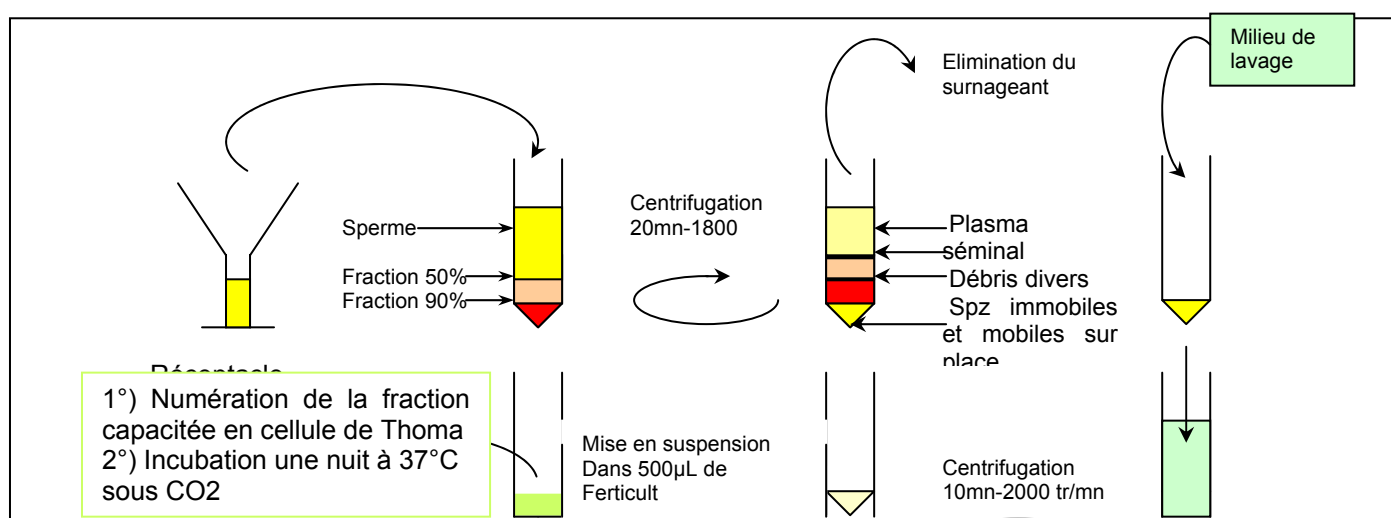
Tableau I : Paramètres du spermogramme

Normes définies par l'OMS (2004)

Paramètres	Normes OMS	Définitions de l'anomalie		Seuil correspondant à une baisse de fécondité
Volume de l'éjaculat	>2 mL	<2 mL	Hypospermie	
		>6 mL	Hyperspermie	
Numération	20-100 millions/mL	<20 millions/mL	Oligospermie	<5 millions/mL
		>200 millions/mL	Polyspermie	
		0	Azoospermie	
Vitalité	>75%	<75%	Nécrospermie	
Mobilité à la 1 ^{ère} heure	>50%, dont 25% de mobiles progressifs	<50% et >25% de mobiles progressifs	Asthénospermie	20-30%
Mobilité à la 4 ^{ème} heure	Diminution de mobilité <50% comparativement à la mobilité de départ	Chute de mobilité >50%	Asthénospermie secondaire	
Spermocytogramme	>30% formes normales	<30%	Tératospermie	20-30%
Leucocytes	<1 million/mL	>1 million/mL	Leucospermie	
pH	7.2-8			

2.3.1.2 Test de capacitation-survie (ou test de migration-survie, TMS)

Le test de capacitation consiste à reproduire *in vitro* les conditions de capacitation par lesquelles les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant après la traversée de la glaire. Il est réalisé pour 1 mL d'éjaculat. Les spermatozoïdes sont séparés par un gradient de densité discontinu constitué de particules de silice colloïdale, permettant d'éliminer le plasma séminal, les débris cellulaires, les spermatozoïdes avec des anomalies morphologiques, les germes, les agglutinats. Il s'agit d'un test fonctionnel indispensable avant une prise en charge en AMP. Le test de survie à 24 heures s'effectue à partir du sperme capacité, les mobilités à t=0 puis à t=24h sont mesurées, puis le pourcentage de spermatozoïdes survivants après 24 heures est déterminé (**figure 12**).



on survie

Spermoculture

Figure 12 : test de capacitation-survie

2.3.1.3 Spermoculture

La mise en culture du sperme est réalisée par ensemencement d'une fraction du prélèvement sur des milieux gélosés enrichis au sang. Elle peut être demandée en cas d'antécédents infectieux génito-urinaires, d'anomalies du spermogramme et systématiquement au cours du bilan pré-FIV. Les signes spermiologiques d'une infection sont l'hyperspermie, la viscosité et le pH augmentés, la présence de polynucléaires, l'asthénospermie, la présence de flagelles enroulés, une diminution de la vitalité. Les conséquences d'une infection chronique peuvent être des lésions directes de l'épithélium épидидymaire, l'apparition d'anticorps anti-spermatozoïdes. La spermoculture doit être réalisée après une désinfection soigneuse des mains et du gland. Les bactéries pathogènes les plus fréquemment retrouvées sont les Entérobactéries type *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis* et les Entérocoques. Le seuil de détection se situe à 10^3 UFC/mL. La présence de Staphylocoques blancs, de Streptocoques du groupe A,B,C ou G, ou d'une flore polymicrobienne, est évocatrice d'une contamination et donc d'une mauvaise aseptie du prélèvement. *Chlamydiae* et *Ureaplasma* sont recherchés par sérologies. La mise en évidence d'une bactérie pathogène impose un traitement antibiotique adapté aux résultats de l'antibiogramme, d'une durée de 10 jours minimum, avec une spermoculture et un ECBU de contrôle 10 jours après l'arrêt du traitement.

2.3.1.4 Evaluation du pouvoir fécondant

En dehors des données spermiologiques précédentes, il est possible d'explorer le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. En pratique, 2 tests sont principalement réalisés : le test post-coïtal (TPC) ou test de Hünher et le test de pénétration *in vitro* (TPIV).

2.3.1.4.1 Le test de Hünher ou test post-coïtal (TPC)

Le TPC permet à la fois d'apprécier la qualité de la glaire cervicale et la présence de spermatozoïdes mobiles dans celle-ci. Il doit être pratiqué en période préovulatoire, 12 heures après un rapport. De la glaire est prélevée au moyen d'un aspiglaire, au niveau de l'exocol et de l'endocol. La qualité de la glaire est évaluée selon un score, le score d'Insler qui prend en compte l'ouverture du col, l'abondance de la glaire, sa filance et sa capacité à cristalliser en feuille de fougère. La présence d'au moins 5 spermatozoïdes mobiles progressifs par champ de microscope (grossissement x40), dans la glaire prélevée au niveau de l'endocol est nécessaire pour conclure à un test positif. Si le test est positif, il fournit un élément de bon pronostic au bilan d'exploration. Si le test est négatif, la mauvaise qualité de

la glaire ou la faible mobilité des spermatozoïdes peuvent expliquer le non franchissement de la glaire. Un nouveau test devra être réalisé et confronté aux données du spermogramme.

2.3.1.4.2 Le test de pénétration *in vitro* (TPIV)

Lorsqu'un TPC négatif est associé à des anomalies du sperme, on peut réaliser le TPIV dont le principe est d'observer le comportement des spermatozoïdes du conjoint et d'un témoin dans la glaire de la patiente et dans une glaire témoin. En pratique, la glaire cervicale est prélevée chez la patiente en période pré-ovulatoire et en dehors de tout rapport.

Parallèlement, le conjoint effectue un prélèvement de sperme à partir duquel sera réalisé un spermogramme. Il s'agit d'un test croisé entre la glaire de la patiente et les spermatozoïdes de son conjoint, la glaire de la patiente et des spermatozoïdes témoins, la glaire témoin et les spermatozoïdes du conjoint, et la glaire témoin et les spermatozoïdes témoins, afin de déterminer si le sperme, la glaire ou les deux sont en cause.

2.3.2 Bilan hormonal

2.3.2.1 Dosage de la FSH

Son dosage permet dans la majorité des cas de déterminer le caractère sécrétoire d'une oligospermie ou d'une azoospermie (FSH élevée).

2.3.2.2 Dosage de la testostérone

Son dosage renseigne sur la fonction endocrine du testicule. Une diminution de la testostérone et de la FSH sera en faveur d'un hypogonadisme hypogonadotrope, tandis qu'une diminution de la testostérone associée à une élévation des gonadotrophines signera une insuffisance testiculaire primitive.

2.3.2.3 Dosage de la LH

Ce dosage est moins informatif. Une augmentation évoque une souffrance de la fonction testiculaire endocrine et élimine une atteinte haute.

2.3.2.4 Dosage de la prolactine

Son dosage se justifiera d'autant plus qu'il existe une gynécomastie et des troubles de la libido. S'il est augmenté, l'existence d'un adénome hypophysaire sera recherchée.

2.4 Bilan génétique

2.4.1 Caryotype

Le caryotype se justifie devant une oligospermie sévère (moins de 5 millions/ml), car c'est dans cette situation qu'est retrouvée une proportion augmentée d'anomalies du caryotype, mais aussi parce qu'une telle oligospermie impose un recours à la fécondation *in vitro* par microinjection d'un spermatozoïde (ICSI).

2.4.2 Recherche de la microdélétion du chromosome Y

Il existe 3 régions situées sur le bras long du chromosome Y impliquées dans la spermatogenèse. Des délétions de ces régions sont retrouvées dans 3 à 13 % des cas d'oligospermie extrême ou azoospermie sécrétoire (Reijo et *al.*, 1996). Ces anomalies sont bien entendues transmissibles à la descendance mâle.

2.4.3 Recherche de mutations du gène CFTR

Certaines mutations du gène CFTR, gène impliqué dans la mucoviscidose, s'expriment chez l'homme par une agénésie des déférentiels à l'origine d'une azoospermie excrétoire.

2.5 Biopsie testiculaire

La biopsie testiculaire permet de déterminer le caractère excrétoire ou sécrétoire d'une azoospermie. Cette exploration chirurgicale nécessite une anesthésie générale. Elle consiste à prélever un fragment de testis, dont l'importance dépendra de sa taille initiale. Ce fragment est directement étudié au laboratoire afin d'évaluer la présence ou non de spermatozoïdes et leur nombre. Elle est déterminante quant à la faisabilité d'une fécondation *in vitro*.

2.6 Sérologies réglementaires

Sont réglementaires les sérologies HIV, Hépatite B, Hépatite C, Syphilis, Chlamydiae. Elles sont valides 6 mois dans le cadre de la prise en charge de l'infécondité.

3 CAUSES ET FACTEURS INFLUENÇANT LA FERTILITÉ MASCULINE

3.1 Causes d'infertilité masculine

Les causes d'infertilité sont définies à partir d'enquêtes provenant des pays industrialisés (Thomas & Forrest, 1980).

Les infertilités d'origine féminine sont les plus fréquentes et représentent 33 à 36% des causes d'infertilité.

Les infertilités d'origine masculine strictes sont en cause dans 20% des cas et les infertilités mixtes dans 39% des cas.

Dans 8% des cas, l'infertilité n'est pas expliquée (**figure 13**).

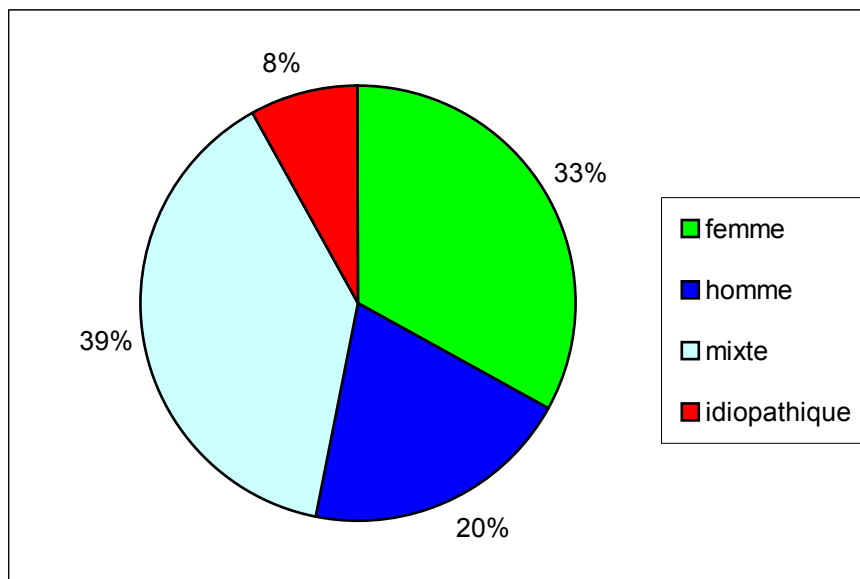


Figure 13 : répartition des causes d'infertilité

Les causes d'origine masculine sont principalement représentées par les OATS ou oligo-asthéo-tératozoospermies (**figure 14**).

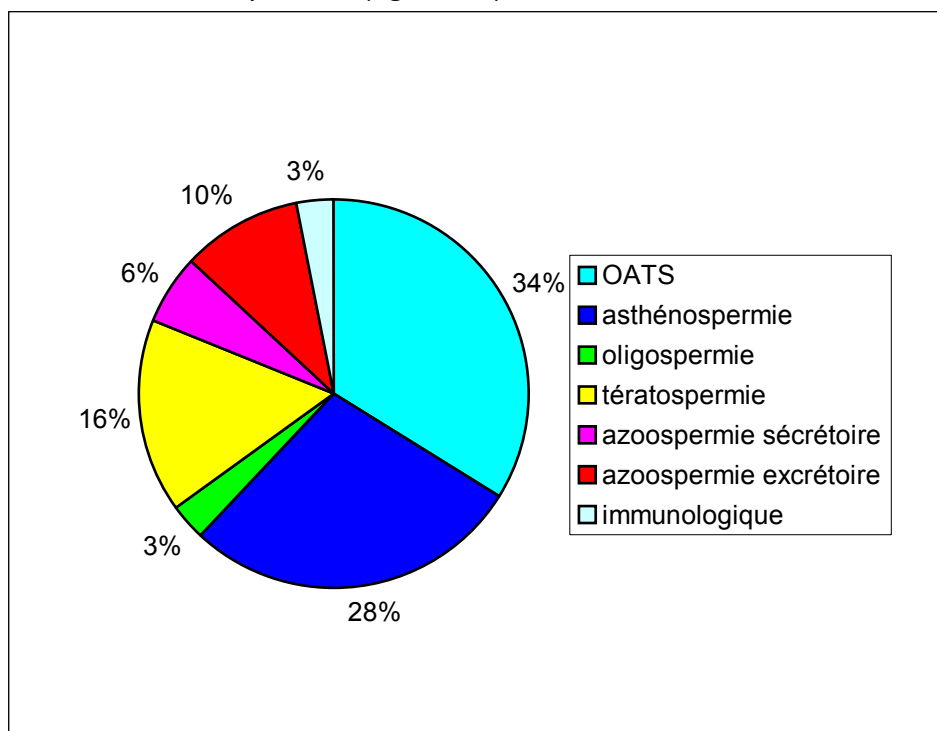


Figure 14 : répartition des causes d'infertilité masculine

3.2 Facteurs influençant la fertilité masculine

Les facteurs masculins comprennent des facteurs spermatiques et des facteurs généraux. Les facteurs spermatiques sont représentés par les altérations des paramètres du sperme. Parmi les facteurs généraux, on retrouve l'âge, l'obésité, les anomalies urogénitales, l'alcool, le tabac, un certain nombre d'agents toxiques, l'élévation de la température. Le rôle des

toxiques dans l'altération de la spermatogenèse est de plus en plus documenté.

L'intoxication peut être d'origine médicamenteuse, en cas de prise prolongée de certaines classes thérapeutiques notamment les alkylants (anticancéreux) (Brydoy et al., 2005, Morris, 2002, Schover, 2005), les fibrates (hypocholestérolémiants), les bêtabloquants (antihypertenseurs) (DrugDex editorial staff eds), le lithium (antidépresseurs) (Isojarvi et al., 2004, Isojarvi et al., 2005); elle peut aussi être professionnelle en cas d'exposition chronique au plomb, au mercure, aux pesticides ou aux herbicides type dibromochloropropane, (Golec et al., 2003, Pina-Guzman et al., 2005, Recio et al., 2001, Sanchez-Pena et al., 2004, Sheiner et al., 2003), aux solvants de type sulfure de carbone (Luderer et al., 2004, Sheiner et al., 2003), à une chaleur intense.

4. APPROCHES THÉRAPEUTIQUES PROPOSÉES

Les traitements de l'infertilité sont des traitements lourds, contraignants, comportant de nombreux effets indésirables et des risques de grossesses multiples. Ils seront proposés au couple en fonction du diagnostic étiologique et des arguments cliniques.

Notre travail se rapportant essentiellement aux troubles de la fertilité masculine, nous évoquerons brièvement les solutions thérapeutiques apportées aux causes d'origine féminine et détaillerons davantage la prise en charge des causes d'infertilité masculine.

4.1 Stimulation ovarienne simple

La stimulation ovarienne simple est un traitement de l'infertilité féminine, proposé en cas de troubles ovulatoires (anovulation et dysovulation). L'induction ovarienne a pour but d'assurer la croissance d'un ou deux follicules jusqu'au stade de follicules matures contenant un ovocyte fécondable. Elle utilise la dose de FSH nécessaire et suffisante pour stimuler et maintenir la croissance du follicule dominant, en laissant les autres s'atrophier. Le déclenchement de l'ovulation peut être physiologique (il succède au pic de LH) ou thérapeutique (36 à 48 heures après une injection de hCG). Cette stimulation paucifolliculaire doit impérativement s'accompagner d'un monitoring des cycles associant dosages hormonaux d'oestradiol et échographies, afin de s'assurer de l'efficacité et de la qualité de la réponse ovarienne et de prévenir le risque de grossesse multiple. Il existe différentes classes thérapeutiques :

les anti-oestrogènes, le citrate de clomifène ou CC (Clomid®) étant le plus utilisé en pratique ;

les gonadotrophines (FSH et LH) ;

les analogues de la Gn-RH surtout utilisés dans le cadre de la multifolliculogenèse, parmi lesquels on distingue les agonistes (Décapeptyl®) et les antagonistes de la Gn-RH (Orgalutran® et Cétrotide®);

la gonadotrophine chorionique (hCG) utilisée pour déclencher l'ovulation.

4.2 Techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP)

Les techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) consistent à reproduire au laboratoire une partie des processus naturels de la fécondation et du développement embryonnaire précoce. Elles sont des solutions palliatives permettant de remédier à certains problèmes d'infécondité. Elles trouvent leur intérêt tant dans les infertilités d'origine féminine,

masculine, mixte ou inexpliquée. Actuellement, ces techniques ont déjà fait leurs preuves mais elles restent une épreuve tant physique que psychologique pour chaque couple. Ces techniques ne sont généralement pas utilisées en première intention, mais en cas d'échec ou d'impossibilité des traitements médicaux ou chirurgicaux. La pratique de l'AMP est strictement réglementée par la loi du 29 juillet 1994, loi révisée en 2004, et par l'arrêté du 12 janvier 1999 qui définissent précisément le cadre médical d'utilisation de ces techniques.

4.2.1 Insémination intra-utérine (IIU)

Pour être efficace, l'IIU doit être associée à une stimulation ovarienne paucifolliculaire (1 ou 2 follicules), la stimulation multifolliculaire serait inutile et surtout dangereuse. Les spermatozoïdes utilisés sont des spermatozoïdes capacités. Les modalités de capacitation sont les mêmes que pour le test de migration-survie. Les spermatozoïdes capacités sont introduits dans la cavité utérine au moyen d'un fin cathéter qui permet de franchir le col utérin. Le moment de l'insémination est un facteur essentiel au succès : 36 heures après le déclenchement artificiel de l'ovulation ou le lendemain d'un pic spontané de LH. On distingue deux modalités d'IIU, l'IAC ou insémination avec sperme de conjoint et l'IAD ou insémination avec sperme de donneur. L'IAC est la technique d'aide à la procréation la moins lourde, proposée chez la femme infertile à trompes perméables ou avec des anomalies de glaire (glairer absente ou hostile). Les indications masculines sont représentées par les altérations modérées des paramètres du sperme sachant qu'il faut injecter un minimum de 500000 spermatozoïdes capacités pour espérer obtenir une grossesse. L'IAD constitue une alternative à la stérilité masculine, la conjointe n'ayant pas nécessairement de trouble de la fertilité. Les résultats de l'insémination intra-utérine sont multi-factoriels : indication, âge de la femme, rang de tentative, type de stimulation ovarienne, moment de l'insémination, qualité de l'injection des spermatozoïdes dans le corps utérin. Toutes indications confondues, les taux de grossesse obtenues sont d'environ 8% par cycle, les meilleurs résultats étant obtenus pour les stérilités cervicales (15%). En revanche, les résultats sont mauvais dans les indications masculines (5%).

4.2.2 Fécondation *in vitro* (FIV)

Il existe deux types de fécondation *in vitro*: la FIV conventionnelle et la FIV-ICSI.

4.2.2.1 Fécondation *in vitro* conventionnelle

Elle consiste à réaliser l'union des gamètes hors du tractus génital féminin, en les mettant en contact l'un avec l'autre, dans un milieu de culture adéquat. L'embryon obtenu est transféré *in utero* ou congelé. Les indications absolues de la fécondation *in vitro* sont pour la femme, la stérilité tubaire définitive et pour l'homme, l'insuffisance spermatique, notamment une numération des spermatozoïdes après le test de migration-survie entre 300 et 500 000 spermatozoïdes, avec une survie positive à 24 heures de culture. Les indications relatives sont représentées par les échecs des autres thérapeutiques (IAC), les stérilités idiopathiques, l'endométriose, les dysovulations, les ovaires polykystiques... Elle comprend cinq étapes successives : multifolliculogénèse, recueil et préparation des gamètes, fécondation *in vitro* et culture embryonnaire, transfert des embryons et enfin soutien de la phase lutéale. L'objectif de la stimulation ovarienne dans le cadre de la FIV est d'obtenir un grand nombre d'ovocytes fécondables. Elle utilise des doses de FSH élevées pour obtenir un recrutement maximum d'ovocytes et empêcher leur atrophie. La stimulation nécessite donc un monitoring échoguidé, 36 heures après le déclenchement de l'ovulation par l'hCG. Les complexes cumulo-ovocytaires recueillis sont ensuite transférés dans du milieu de culture et

conservés dans une étuve à 37°C sous atmosphère enrichie en CO₂. Le recueil et la préparation des spermatozoïdes se font selon les mêmes modalités que pour l'IIU. L'insémination se fait quelques heures après la ponction, il est habituel de déposer environ 50 à 100 000 spermatozoïdes mobiles dans chaque puits d'insémination. Environ 24 heures après l'insémination, les ovocytes sont examinés au microscope à la recherche d'un signe objectif de fécondation tel que l'observation des *pronuclei*. La qualité des embryons constituant un facteur pronostic important de la chance d'implantation, leur morphologie est appréciée à J2 et à J3 selon une classification des embryons qui tient compte du nombre et de la régularité des blastomères ainsi que de la présence ou non de fragments cytoplasmiques. La morphologie des embryons est exprimée au moyen de trois chiffres : le premier définit le nombre de blastomères, le second correspond à la régularité des cellules (1 si elles sont régulières, 2 si elles sont irrégulières), le troisième correspond au taux de fragmentation cytoplasmique (1 pour un taux inférieur à 10%, 2 si supérieur). Le second et le troisième chiffres sont inscrits entre parenthèses. Par exemple, 8(1-1) signifie embryon à 8 blastomères réguliers non fragmentés, autrement dit, embryon de bonne qualité. En règle générale, le transfert est effectué à J2 si moins de trois embryons ont été obtenus, et à J3 si trois embryons ou plus ont été obtenus. Le transfert à J3 permet une meilleure évaluation de la qualité des embryons, de la stratégie du transfert et de la congélation. Un embryon au stade de blastocyste peut être proposé lorsque la patiente présente une malformation utérine ou après des échecs répétés de FIV. La phase lutéale est le plus souvent soutenue en administrant un traitement progestatif pendant 15 jours. Comme pour les IAD, il existe une variante avec donneur de sperme appelée FIV-D, dans les cas de stérilité masculine associée ou non à des troubles de la fertilité féminine. Environ 10 % des embryons s'implantent après transfert intra-utérin. Le transfert de deux embryons s'accompagne donc de 20% de chances de grossesse. La mauvaise qualité embryonnaire semble être la cause principale des échecs.

4.2.2.2 FIV-ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)

La fécondation *in vitro* avec micro-injection n'utilise qu'un seul spermatozoïde qui est introduit dans le cytoplasme de l'ovocyte à l'aide d'une micro-pipette. Les indications absolues de l'ICSI sont les OATS sévères, notamment lorsque le nombre de spermatozoïdes mobiles suite au test de migration-survie est inférieur à 300 000, et la plupart des azoospermies excrétoires et sécrétoires si la biopsie est positive. Les indications relatives concernent les échecs de FIV conventionnelles. L'ICSI comporte la même séquence de cinq étapes décrites précédemment, les différences portant sur l'origine possible des spermatozoïdes et sur la fécondation *in vitro* de l'ovocyte. En effet, les spermatozoïdes peuvent provenir d'un éjaculat ou d'un prélèvement chirurgical. La micro-injection est réalisée à l'aide d'un micro-manipulateur, appareil complexe qui comprend deux bras, l'un tient une pipette de contention servant à immobiliser l'ovocyte, l'autre tient la micro-pipette d'injection. Un seul spermatozoïde est injecté, il est sélectionné en fonction de sa mobilité et sa morphologie.

Pour faire une synthèse des indications de ces différentes techniques en fonction de l'anomalie détectée chez l'homme, on peut se référer au tableau suivant (**Tableau II**).

Tableau II : Les techniques d'AMP et leurs principales indications

Altération modérée des paramètres du sperme	IAC, sous réserve d'une perméabilité tubaire validée.
Troubles mécaniques de l'éjaculation	

Echec des IAC Indications tubaires Infertilité inexpiquée	FIV conventionnelle
OATS importantes, TMS >1 million/mL	
OATS très sévères, TMS <1 million/mL	FIV-ICSI
Azoospermie avec prélèvement chirurgical des spermatozoïdes positif	
Echec de FIV conventionnelle	
Azoospermie avec prélèvement chirurgical des spermatozoïdes négatif Refus de l'ICSI par le couple	IAD FIV-D

Toutefois, il est important de réaliser que la prise en charge du couple ne saurait se limiter au seul aspect médical et technique. En effet, il est primordial de considérer la dimension psychologique et affective des patients. Ainsi, dans certaines situations, l'intervention des psychologues pourrait même être qualifiée d'aide à la procréation, notamment lorsqu'elle permet de surmonter les difficultés liées au désir et aux troubles de la sexualité. Nous ne développerons pas davantage cet aspect humain de l'AMP, nous pourrions consacrer le travail entier d'une thèse à ce sujet, qu'il ne suffirait pas.

5. APPROCHE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE L'INFERTILITÉ D'ORIGINE MASCULINE VIA L'ENQUÊTE RÉALISÉE AU CHU DE NANTES

5.1 Introduction

De la lecture de nombreux articles traitant de l'infertilité masculine et du rôle des facteurs environnementaux, est née l'idée de rédiger un questionnaire portant sur les habitudes des hommes infertiles pris en charge au CHU de Nantes. L'objectif de ce questionnaire est de mettre en évidence d'éventuels groupes à risque, à savoir des groupes d'hommes pour lesquels les conditions environnementales et socio-professionnelles constitueraient des facteurs de risque à l'existence d'une infertilité.

5.2 Revue bibliographique

Il est ressorti de la littérature qu'un certain nombre de facteurs comme la consommation de tabac (Hull et al., 2000, Sepaniak et al., 2005, Zitzmann et al., 2003), et d'alcool (Muthusami & Chinnaswamy, 2005), la pollution (De Rosa et al., 2003) l'exposition professionnelle à des produits chimiques comme les insecticides (Recio et al., 2001, Sanchez-Pena et al., 2004), solvants, vernis, l'exercice d'une profession imposant une position assise prolongée (Bujan et al., 2000, Grove et al., 2002, Sheynkin et al., 2005), constituaient des facteurs de risques non négligeables et imputables à l'hypofertilité masculine. Dans un article paru dans *Fertility and Sterility* (Hull et al., 2000), il ressort que le tabagisme actif masculin diminue de façon significative la fertilité masculine. Dans cet article, le délai nécessaire à concevoir apparaît comme un bon marqueur de mesure de la fertilité. Ainsi, dans la population des couples en

désir d'enfant, un délai de conception supérieur à 12 mois est nécessaire pour 11.9% d'entre eux. Si l'homme fume 10 cigarettes par jour on ne constate pas d'augmentation significative du pourcentage de couples pour lesquels le DNC est supérieur à 12 mois, par contre s'il fume plus de 20 cigarettes par jour, le pourcentage augmente significativement à 17.9%. Une autre étude menée par l'Institut de Médecine de la Reproduction de Munich (Zitzmann et al., 2003), a démontré que pour les couples pris en charge dans les centres de Biologie de la Reproduction, quelle que soit la technique de fécondation *in vitro*, conventionnelle ou ICSI, le tabagisme actif masculin diminue de façon significative le taux de réussite de la fécondation *in vitro*. Pour la FIV conventionnelle, le taux de réussite passe de 32 à 18%, et pour la FIV-ICSI il passe de 38 à 22%. D'après Muthusami et son équipe (Muthusami & Chinnaswamy, 2005), la consommation chronique d'alcool produit des effets délétères sur la qualité de la production des spermatozoïdes par un effet toxique direct. Ils ont constaté des anomalies de la numération, du mouvement et de la morphologie des spermatozoïdes. La consommation chronique d'alcool agit également sur la sécrétion des hormones masculines. La pollution atmosphérique est aussi accusée d'affecter la fertilité masculine. De Rosa et son équipe (De Rosa et al., 2003) ont démontré qu'il existait une corrélation inverse entre la présence de marqueurs toxicologiques des polluants dans l'organisme et la qualité des paramètres du sperme. Ainsi, la présence de taux élevés de méthémoglobine (témoin d'une intoxication chronique au monoxyde de carbone), de plomb, de monoxyde d'azote, sont inversement corrélés à la mobilité et la motilité des spermatozoïdes. D'autres études se sont intéressées aux conditions de travail de certains hommes, ainsi Sheynkin et son équipe (Sheynkin et al., 2005) décrivent une diminution de la fertilité chez les hommes travaillant avec des ordinateurs portables, en particulier posés sur leurs genoux. En effet cette nouvelle façon de travailler est à l'origine d'une élévation significative de la température scrotale. A long terme, cette élévation de température a un impact négatif sur la spermatogenèse, en particulier chez la nouvelle génération de jeunes hommes. Une autre cause d'élévation de la température scrotale est liée à la conduite d'un véhicule pendant des périodes prolongées et répétées. Ainsi, Bujan et son équipe (Bujan et al., 2000) ont montré qu'après 2 heures de conduite, la température scrotale s'élevait de 1.7 à 2 degrés de plus qu'après 2 heures de marche.

Même si le tabac est très régulièrement incriminé dans la littérature de ces dernières années en tant que facteur d'hypofertilité masculine, le rôle de l'environnement n'est plus à négliger. L'objet de l'enquête est donc de mettre en évidence, si les habitudes de vie et les facteurs environnementaux de la population masculine consultant pour des troubles de la fertilité constituent réellement des facteurs de risque à l'apparition ou l'aggravation d'une hypofertilité.

5.3 Matériels et Méthodes

5.3.1 Les patients

Cette étude prospective a consisté à recueillir des informations, grâce à un questionnaire, à propos des habitudes de vie des hommes consultant pour infertilité dans le Service de Médecine du Développement et de la Reproduction du CHU de Nantes. Les hommes interrogés appartiennent à deux groupes distincts, les premiers ont répondu au questionnaire

à l'occasion d'un bilan d'infertilité, ils appartiennent au « groupe pré-FIV », les seconds ont répondu lors de la venue de leur conjointe pour la ponction ovocytaire précédant la fécondation *in vitro*, ils appartiennent au « groupe FIV ». Ces 2 cohortes sont indépendantes, les hommes du groupe pré-FIV sont différents de ceux inclus dans le groupe FIV. En effet, un délai moyen de 12 mois sépare les 2 événements, consultation pour infertilité et prise en charge cette infertilité par FIV ou FIV-ICSI. Notre enquête est prospective et les 2 cohortes ont été recrutées en même temps. Le choix de cette catégorisation en groupes a été motivé par l'intention de mettre en évidence, même s'il ne s'agit pas des même patients suivis d'une cohorte à l'autre, s'il existait ou non des différences significatives dans les habitudes des hommes entre la première consultation pour infertilité et la prise en charge thérapeutique par FIV ou FIV-ICSI. Dans le premier groupe, l'effectif est de 159 hommes et dans le second de 230 hommes.

5.3.2 L'enquête

L'enquête a débuté le 26 mai 2005 et s'est achevée le 26 novembre 2005 (durée de l'enquête: 6 mois). Nous avons recueilli 389 (159+230) questionnaires correctement remplis, c'est à dire qu'il y avait une réponse à chaque question et que cette réponse était interprétable. Le questionnaire proposé était anonyme. Un numéro a été attribué à chacun, selon un ordre chronologique. La lettre F précède les numéros attribués aux questionnaires FIV et FIV-ICSI, afin de les distinguer des questionnaires Pré-FIV. Pour le groupe Pré-FIV, la numérotation se fait donc de 1 à 159, et pour le groupe FIV-FIV/ICSI, elle commence à F1 et se termine à F230. Ce questionnaire (**annexe 1**) se présente sous la forme de questions fermées (réponses attendues : oui ou non) ou semi-ouvertes (les réponses possibles sont proposées). Ces questions, au nombre de 8, se rapportent au mode de vie des patients. Le choix des questions a été orienté par les différents articles évoqués, au cours de la revue bibliographique. Les sujets abordés se rapportent donc à la consommation tabagique, à l'exposition professionnelle à des produits toxiques, à la chaleur, à l'exposition à la pollution. Nous avons également anticipé le sujet de la seconde partie de notre travail, portant sur les lésions de l'ADN des spermatozoïdes causées par les radicaux libres oxydants, en posant la question d'une alimentation riche en fruits et légumes frais, source d'antioxydants. Les 8 items abordés sont les suivants :

- 1- le secteur d'activité professionnelle. 11 catégories socio-professionnelles sont proposées, afin de savoir si toutes les catégories sont représentées ;
- 2- le rythme de travail (jour/nuit) ;
- 3- le volume horaire hebdomadaire (<35 heures, 35-40 heures, >40 heures) ;
- 4- l'exposition régulière à des produits toxiques de type solvants et vernis, pesticides et fongicides, détergents et produits d'entretien ;
- 5- l'exposition régulière à une source de chaleur (soudure, chantiers, fours) ;
- 6- le suivi d'un traitement médicamenteux (antalgiques, antihypertenseurs, antidépresseurs) ;
- 7- le tabagisme (actif, ancien, importance de la consommation) ;
- 8- la consommation régulière de fruits et légumes frais ;

L'année de naissance et le lieu de domiciliation sont également demandés pour compléter cette enquête, à titre informatif. L'année de naissance nous apporte un indice sur l'âge du désir de paternité et le lieu de domiciliation pourrait être corrélé au niveau de pollution des grandes agglomérations.

5.4 Résultats

Les résultats obtenus sont répertoriés dans les 2 tableaux figurant en **annexe 2**. Le premier rassemble les 159 résultats obtenus pour le groupe des hommes ayant répondu à notre

questionnaire à l'occasion d'un bilan pré-FIV, le second les 230 résultats des hommes suivis en FIV ou FIV-ICSI. Afin de mieux visualiser ces résultats, nous les avons transcrits sous forme de graphiques, **annexe 3**, permettant de comparer les 2 populations (FIV et ICSI). Dans un premier temps, l'analyse de nos résultats consiste à comparer les réponses obtenues dans chacun des 2 groupes de sujets FIV conventionnelle et FIV-ICSI. Afin de savoir s'il existe des différences fondamentales entre ces 2 groupes, nous avons réalisé une synthèse (**tableau III**) des résultats figurant en **annexe 2**. Nous appliquons le test statistique de comparaison des pourcentages pour ces 2 cohortes. Il s'agit du test du *Chi deux*, appliqué à deux populations non appariées. Nous déterminons pour chacun des paramètres étudiés la valeur du (**p**) correspondant à la valeur du *Chi deux*. D'après cette valeur (**p**), nous acceptons ou refusons l'hypothèse H0 : « Il n'existe pas de différence significative entre le groupe pré-FIV et le groupe FIV ou FIV-ICSI ». Si $p > 0.05$, nous acceptons cette hypothèse au risque d'erreur à 5%. Si $p < 0.05$, nous la refusons. Pour ce faire, nous utilisons un logiciel de statistiques en ligne (<http://oms2.b3e.jussieu.fr/biostaTGV/>), qui détermine la valeur (**p**) pour chaque item étudié à partir des effectifs totaux. Les données sous forme de pourcentages et les résultats du test de comparaison figurent dans le tableau ci-après (**Tableau III**).

Tableau III : comparaison des données obtenues pour les 2 cohortes interrogées

			PRE-FIV n=159	FIV-ICSI n=230	Test du <i>Chi deux</i> p=	
Année de naissance		Avant 1975	75.5%	75.2%	p=0.95	
		1975 et après	24.5%	24.8%		
Lieu de résidence		<30 000 hab	58.5%	67.4%	p=0.09	
		>30 000 hab	41.5%	32.6%		
Rythme de travail		Jour	84.9%	86.5%	p=0.45	
		Nuit	11.9%	12.2%		
		SE, Retraité	3.2%	1.3%		
Volume horaire hebdomadaire		<35 h	4.4%	0.9%	p=0.01	
		35-40h	57.8%	71.3%		
		>40h	34.6%	26.5%		
		SE, Retraité	3.2%	1.3%		
Exposition aux toxiques		Oui	20.8%	22.2%	p=0.83	
		Non	79.2%	77.8%		
Exposition à la chaleur		Oui	23.3%	19.1%	p=0.39	
		Non	76.7%	80.9%		
Traitement		Oui	14.5%	10.9%	p=0.37	
		Non	85.5%	89.1%		
Tabagisme	OUI	Actif	36.8%	43.9%	p=0.02	p=0.97
		Ancien <3 ans	50.2% } 13.4%	6.1% } 50%		
	NON	Jamais	47.8% } 2%	43.9% } 6.1%	p=0.15	
		Ancien >3 ans				
Fruits et légumes frais		Oui	57.9%	49.6%	p=0.13	
		Non	42.1%	50.4%		
Association de FR		3	6.3%	4.6%	p=0.79	
		2	12.6%	14.3%		
		1	50.3%	48.7%		
		0	30.8%	32.6%		

Après application du test du *Chi deux*, pour chaque paramètre étudié, nous constatons qu'il existe une différence significative entre nos 2 populations, au risque 5%, pour 2 paramètres, à savoir « volume horaire hebdomadaire » ($p=0.01$) et « tabagisme oui » ($p=0.02$).

A propos du volume horaire hebdomadaire, on peut s'interroger quant à la signification de cette différence de représentation entre les 2 populations. L'intérêt de ce résultat étant nul, nous ne chercherons pas à l'analyser.

En ce qui concerne le tabagisme, après application du test du *Chi deux* pour le critère « tabagisme : oui/non » pour les 2 cohortes, on obtient $p=0.97$ en faveur d'une différence non significative au risque 5%. Cependant, au sein du groupe fumeurs « oui », si le test du *Chi deux* est appliqué au sous-groupe « actif » et « ancien <3 ans », on obtient une valeur de $p<0.05$ ($p=0.02$), c'est à dire qu'il existe une différence significative entre ces 2 groupes. Cette différence s'exprime en la faveur d'une proportion plus importante de fumeurs actifs dans le groupe FIV ou FIV-ICSI, que dans le groupe pré-FIV. *A priori*, s'il devait y avoir une différence significative entre nos 2 populations d'hommes, nous souhaiterions qu'elle soit dans le sens d'une prise de conscience des effets délétères du tabac sur la qualité du sperme.

Pour tous les autres résultats, comme il n'existe pas de différence significative ($p>0.05$) entre les 2 cohortes, nous décidons de regrouper les données obtenues pour chacune en un seul et même effectif de 389 hommes et poursuivons l'analyse de nos résultats comme tel.

Ainsi, à propos de l'âge des hommes interrogés, le questionnaire nous informe que 75,3% d'entre eux a plus de 30 ans, ce qui finalement correspond à l'âge moyen du désir de paternité. D'après les données démographiques disponibles dans de nombreuses revues socio-démographiques, l'âge moyen de la paternité en France est de 29,4 ans et en Europe de 29,3 ans (www.population-demographie.org). Un tiers des hommes interrogés (37% exactement) vivent dans des villes de moyenne et grande importance (villes de plus de 30 000 habitants). Le rôle de la pollution comme facteur de risque de l'infertilité masculine est difficile à évaluer dans cette situation. En effet, il faudrait pouvoir doser les métabolites des polluants atmosphériques dans le plasma de ces hommes. D'après l'ouvrage, *The science of air : concepts and applications*, F.R. Spellman, l'indice de pollution est calculé à partir de la mesure de différents polluants émis dans l'atmosphère, notamment le dioxyde de soufre, les oxydes d'azote, l'ozone, le monoxyde de carbone, les particules en suspension, le benzène, le toluène et les xylènes. Cet indice s'échelonne de 1 à 10, et à chacun de ces chiffres correspond un adjectif qualifiant la qualité de l'air atmosphérique (1 : très bon, 10 : très mauvais). Ainsi, d'après le centre de surveillance de la qualité de l'air des Pays de la Loire (*Air Pays de Loire*), pour la ville de Nantes et son agglomération cet indice varie entre 2,6 (indice bon à très bon) en période d'hiver et 4,4 (indice moyen) en période d'été, ce qui permet de la définir comme une ville peu polluée. Par ailleurs cette bonne qualité de l'air est aussi retrouvée pour les villes de Rennes, Angers et Vannes ainsi que leurs agglomérations (indices variant entre 3 et 4.5), villes regroupant la majorité des hommes pris en charge pour infécondité et ayant participé à l'enquête. Bien sûr, comme nous l'avons spécifié auparavant, seulement un tiers des patients suivis par le service de Médecine de la Reproduction réside en zone urbaine, nous ne possédons pas de données similaires quant à l'évaluation de la qualité atmosphérique pour les zones rurales, mais dans le cadre de notre étude il semblerait que la qualité de l'air ne soit pas un indicateur pertinent.

Les secteurs d'activités professionnelles représentés sont variés. Si la proportion de chaque secteur d'activité est comparée à sa représentation au sein de la population masculine en âge d'exercer une activité professionnelle (selon les chiffres publiés par l'INSEE, <http://www.insee.fr>), quelques déséquilibres peuvent être constatés. En effet, les cadres supérieurs et ingénieurs (23% dans le groupe pré-FIV, 23% dans le groupe FIV, *versus* 12,2% selon l'INSEE) sont significativement surreprésentés ($p=0,01$ et $0,008$ respectivement) au dépens des ouvriers, employés (36% dans le groupe pré-FIV, *versus* 49,4% selon l'INSEE, soit $p=0,02$) et de la fonction publique (16% dans le groupe pré-FIV, 11% dans le groupe FIV, *versus* 25,8% selon l'INSEE, soit $p=0,038$ et $0,001$ respectivement).

Concernant le rythme de travail, 64,5% de ces hommes travaille 35 heures par semaine. Ce dernier indice ne nous apporte aucun argument majeur dans l'analyse de nos résultats, cependant il nous confirme que notre échantillonnage est représentatif de la population masculine active qui est aussi la population en âge de procréer.

L'exposition régulière à des produits toxiques et à une source de chaleur dans le cadre d'une activité professionnelle sont des facteurs de risque difficiles à analyser, car il n'existe aucune référence nous permettant de comparer nos résultats avec ceux de la population masculine générale. Nous ne pouvons donc pas conclure à une représentation accrue ou non des hommes pour lesquels les conditions de travail les exposent à des produits toxiques reconnus comme altérant la fertilité masculine et/ou à une source de chaleur.

Le suivi d'un traitement antiinflammatoire, antihypertenseur, antidépresseur n'est pas informatif, seulement 12,7% des hommes interrogés étaient en cours de traitement.

La question se référant à la consommation de fruits et légumes frais nous montre que les habitudes alimentaires masculines n'incluent pas systématiquement des sources de vitamines et anti-oxydants, en effet 46% des hommes consomment moins d'un fruit ou légume frais par jour, or nous évoquerons plus tard le rôle des anti-oxydants dans la prévention des lésions de l'ADN des spermatozoïdes (Greco et *al.*, 2005a, Greco et *al.*, 2005b, Sierens et *al.*, 2001, Sierens et *al.*, 2002, Silver et *al.*, 2005). Finalement, le seul paramètre apparaissant comme significativement déterminant est le tabagisme. 44% des hommes interrogés sont des fumeurs actifs et 6% sont des anciens fumeurs pour lesquels l'arrêt du tabac date de moins de 3 ans. Pour ces derniers, on considère que les effets délétères du tabac ne sont pas encore effacés. D'après divers études (Benhamou et *al.*, 1989, Clavel-Chapelon et *al.*, 1997, Clavel et *al.*, 1987, Peto et *al.*, 2000), les bénéfices liés à l'arrêt du tabac deviennent significatifs à 5 ans pour les cancers et autres pathologies. L'espérance de vie et les risques obstétricaux sont les mêmes qu'un non fumeur à 15 ans. Par contre, en ce qui concerne les bénéfices liés à l'arrêt du tabac sur l'hypofertilité masculine, les études n'abondent pas. Aucune étude n'a établi qu'à partir d'un certain délai de sevrage tabagique les troubles liés au tabagisme s'effacent. Nous avons donc conclu qu'un arrêt datant de moins de 3 ans n'était pas suffisant pour inclure les hommes interrogés dans le groupe des non-fumeurs. On les assimile donc au groupe des fumeurs, qui au total comprend 50.1% des hommes inclus dans notre enquête. D'après les chiffres publiés par l'INSEE (<http://www.insee.fr>), la population masculine âgée de 24 à 55 ans, qui est également notre échantillon de population, c'est à dire les hommes en âge de procréer, comprend 31,8% de fumeurs. La différence entre ces populations de fumeurs (hommes infertiles *versus* population masculine témoin) est significative au risque 5% (**p<0.001**). Pour conclure, nous avons considéré chacun des facteurs de risque étudiés isolément et en association avec les autres. Seulement 31,7% des hommes interrogés ne présentent, *a priori*, aucun de ces facteurs de risque, 49,5% en présentent 1, 13,5% en associent 2, et 5,3% associent les 3.

5.5 Discussion

L'objectif de notre enquête était d'individualiser des groupes d'hommes dont les habitudes et les conditions socio-professionnelles nous permettraient de définir des groupes à risque. Un groupe à risque se définit par un ensemble d'individus ayant des pratiques semblables comportant des facteurs de risque accrus d'accidents ou de maladies. Dans le cadre de notre enquête, ces pratiques à risque sont soit d'ordre professionnel, soit d'ordre social (habitudes de vie, de consommation). Les pratiques professionnelles à risque sont représentées par l'exposition régulière à des produits toxiques, comme les solvants, les vernis, les pesticides, les fongicides, les détergents, et/ou à une source de chaleur. Cependant, faute de données nous permettant de comparer notre population masculine à la population masculine active générale, nous ne pouvons identifier de groupe à risque. Au sein des pratiques professionnelles à risque, nous pouvons indirectement inclure les conditions de travail, les responsabilités associées à ce travail ou encore l'état d'anxiété que peut générer ce travail. Ainsi, d'après les résultats obtenus à propos de la représentation des différents secteurs d'activité professionnelle nous constatons que les professions exercées par les cadres supérieurs et ingénieurs sont significativement plus représentées que dans la population active générale au dépens des ouvriers, des employés et de la fonction publique. Est-ce que cette population constitue une catégorie professionnelle à risque ou s'agit-il d'un biais de recrutement ? Il nous est difficile d'argumenter en faveur de cette observation d'existence d'un groupe à risque parmi les professions à haute responsabilité.

Concernant les pratiques à risque d'ordre social, parmi lesquelles nous incluons le tabagisme et les habitudes alimentaires, l'analyse des résultats nous montre finalement que le seul groupe à risque que nous avons pu faire ressortir de cette enquête est représenté par les fumeurs actifs. En effet, la population masculine que nous avons interrogé au cours de notre enquête se compose de 44% de fumeurs actifs contre 31.8% dans la population générale, selon les données fournies par l'INSEE ($p < 0.001$). Les fumeurs actifs sont donc en proportion significativement plus importante dans la population des hommes pris en charge dans le Service de Médecine du Développement et de la Reproduction du CHU de Nantes que dans la population générale. Alors que les médias et la presse scientifique diffusent largement des informations concernant les effets délétères du tabac, comme le développement de cancers broncho-pulmonaires et digestifs et de maladies cardio-vasculaires, mais aussi sur les retentissements du tabac sur la fertilité à la fois de la femme et de l'homme, nous pensions nous trouver en présence d'une population masculine sensibilisée à ces risques du tabac et donc une population constituée majoritairement de non-fumeurs. De toute évidence le message de prévention ne suffit pas. Cette observation est certes décevante quant à l'impact de la prévention antitabagique auprès des couples et en particulier des hommes infertiles, mais elle est peut être interprétée comme suit : parmi les hommes pour lesquels le couple est pris en charge par FIV ou FIV/ICSI, il y aurait une concentration des fumeurs, ce qui renforcerait notre hypothèse de la responsabilité du tabac dans les troubles de la fécondité. Il existe donc un important travail de prévention à réaliser auprès des couples, au sujet des risques du tabac sur la fertilité de l'homme, notamment au cours des premières consultations pour infécondité. Ainsi, il est important de leur rappeler que le tabac peut réduire la production et la qualité des spermatozoïdes (Arabi & Shareghi, 2005), et de surcroît, les conséquences du tabac pourraient à long terme s'exprimer sur la santé de l'enfant (Berthiller & Sasco, 2005). De plus, les effets du tabac sur la fertilité sont réversibles, les bénéfices liés à l'arrêt du tabac, même s'ils ne sont pas immédiats, ne sont pas négligeables et doivent motiver les fumeurs à arrêter leur consommation. Pour les couples souhaitant recourir à des techniques d'AMP, il apparaît donc indispensable d'arrêter toute consommation de tabac au cours du traitement afin d'optimiser les chances du succès.

Finalement, cette enquête fait ressortir 2 populations que l'on peut qualifier de « groupes à risque », la première est une population à risque d'ordre professionnel représentée par les cadres supérieurs et ingénieurs, la seconde est une population à risque d'ordre social, représentée par les tabagiques. En recoupant ces 2 informations, nous pourrions supposer qu'il existe un lien de cause à effet entre ces 2 catégories, à savoir les hautes responsabilités professionnelles seraient génératrices de stress et pourraient s'accompagner d'un comportement addictif vis-à-vis du tabac (John et al., 2006). C'est pourquoi nous avons analysé les résultats pour la condition « cadres supérieurs/ingénieurs et tabac ». Il s'avère que 42 des hommes appartenant au groupe « cadres supérieurs/ingénieurs », sont des fumeurs, soit 47%. Une fois encore, la proportion de tabagique est significativement plus élevée ($p < 0,01$) dans ce groupe d'hommes par rapport à la population générale, mais elle ne l'est pas comparativement à l'ensemble des hommes ayant participé à notre étude ($p = 0,40$).

Finalement, quelque soit la catégorie professionnelle, le tabac apparaît comme un véritable facteur de risque, et du même coup une cible majeure pour remédier à ces troubles de la fertilité.

Afin d'essayer d'apporter des preuves concrètes des effets du tabac sur la fertilité masculine, le second temps de notre travail a consisté à tenter d'évaluer les conséquences de la consommation de tabac sur la fertilité masculine, en terme de qualité génomique des spermatozoïdes, puis de considérer les conséquences possibles de la fécondation d'un ovocyte dont le matériel génétique serait endommagé.

**CHAPITRE 4 DETERMINATION DU TAUX DE FRAGMENTATION DE L'ADN
SPERMATIQUE SELON LA TECHNIQUE TUNEL,
APPLICATION A UNE POPULATION MASCULINE DE FIV-ICSI**

1.INTRODUCTION

Suite aux observations issues de l'enquête, nous avons voulu mettre en évidence concrètement les conséquences de certaines habitudes de vie et des facteurs environnementaux, dans un premier temps sur la qualité génomique des spermatozoïdes, et dans un second temps sur la qualité du *conceptus*.

2.REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Certains composés chimiques, comme le benzopyrène (goudron du tabac), sont de puissants agents mutagènes, altérant la qualité des cellules reproductrices. Outre les mutations de l'ADN, les composants de la fumée du tabac sont aussi à l'origine d'un stress oxydatif générant des radicaux libres oxydants à l'origine de lésions au niveau de l'ADN des cellules spermatiques (Loft et al., 2003, Saleh et al., 2002, Sepaniak et al., 2004, Sepaniak et al., 2005), Belcheva et al., 2004).

Le stress oxydatif est connu pour affecter l'intégrité du génome des spermatozoïdes en induisant des cassures simple ou double-brins de l'ADN (Agarwal et al., 2003, Aitken et al., 1998, Baumber et al., 2003, Lopes et al., 1998a, Moustafa et al., 2004, Twigg et al., 1998). De nombreuses études consacrées à la génération des radicaux libres oxydants sont parues. Elles distinguent les attaques oxydatives provenant de l'extérieur de la cellule, des métabolites oxydatifs produits par la cellule elle-même. Parmi les sources extérieures produisant des radicaux libres oxydants, outre les composants de la fumée du tabac, sont évoquées la pollution atmosphérique (Evenson & Wixon, 2005), les radiations ionisantes (Dietrich et al., 2005, Krassas & Pontikides, 2005, Schover, 2005, Schover et al., 1999, Wee et al., 2005), les produits chimiques toxiques (Sanchez-Pena et al., 2004). A partir de l'ensemble de ces données, il est possible de tenter de reproduire en laboratoire des conditions proche de la situation *in vivo*. Ainsi, il est possible d'accélérer la génération de métabolites oxydatifs et d'étudier les conséquences directes sur le génome des spermatozoïdes, puis dans un second temps d'essayer d'y remédier. En ce qui concerne la production de radicaux libres oxydants par le spermatozoïde lui-même, il s'agit d'un processus physiologique normal et nécessaire pour la survenue de la capacitation et la réaction acrosomique (de Lamirande & Gagnon, 1993). Cependant, leur présence en grande quantité dans le liquide séminal est néfaste pour l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes. Quelle que soit leur origine, les radicaux libres oxydants ont tous pour effet d'induire des cassures dans l'ADN. On parle alors de fragmentation de l'ADN.

Cependant, le stress oxydatif n'explique qu'en partie la fragmentation de l'ADN, car d'autres mécanismes entrent en compte comme l'apoptose des cellules germinales au cours de la spermatogenèse (Levy & Seifer-Aknin, 2001, Marchetti & Marchetti, 2005, Sakkas et al., 2002), ou un défaut du remodelage et de la compaction de la chromatine au cours du processus de spermiogenèse du à la topoisomérase II, dont l'activité mal régulée entraînerait des fragments d'ADN non réparés (Sergeyev et al., 2005a). Toutefois, nous avons décidé d'étudier la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes en tant que reflet du stress oxydatif. Il existe un certain nombre de techniques visant à tester l'intégrité génomique de l'ADN des spermatozoïdes, la plupart permettant de définir un index ou taux de fragmentation de l'ADN. L'analyse unicellulaire sur gel d'électrophorèse (COMET pour Cell gel electrophoresis assay), l'analyse de la structure de la chromatine des spermatozoïdes (SCSA pour Sperm Chromatin Structure Assay), le test *in situ* de cassure dans l'ADN (NT pour Nick Translation) et le marquage des brins d'ADN avec la terminale désoxynucléotidyle transférase (TUNEL pour Terminal-désoxynucleotidyl-transferase Uridine Nick-End Labeling) sont actuellement les techniques les plus utilisées pour mesurer l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes. Le TUNEL et le COMET détectent les cassures simple et double-brins de l'ADN. La technique NT peut détecter les cassures simple-brins et SCSA les anomalies de compaction de la chromatine.

Nous nous sommes par ailleurs interrogés quant aux conséquences éventuelles d'une fécondation par un spermatozoïde dont l'ADN est fragmenté. En effet, l'organisation structurale de la chromatine du spermatozoïde est déterminante pour sa fonction, car la condensation de la chromatine au cours du transit épидидymaire permet le transport du matériel génétique « protégé » jusqu'à l'ovocyte, puis sa décondensation après fécondation de l'ovocyte. Sakkas et son équipe (Sakkas et al., 1996) ont observé que les ovocytes qui n'ont pas été fécondés après ICSI ou FIV avec des spermatozoïdes à haut degré de fragmentation, contenaient un nombre supérieur de spermatozoïdes à chromatine condensé. Ils l'expliquent par le fait que l'ADN endommagé des spermatozoïdes sélectionnés lors de l'ICSI peut perturber le phénomène de décondensation de la chromatine et conduire à un échec de fécondation.

Rappelons toutefois que la présence de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté dans le sperme est un phénomène physiologique normal. L'ovocyte possède toute une machinerie cellulaire capable de réparer le matériel génétique du spermatozoïde fécondant. La réparation ovocytaire des dommages de l'ADN implique des mécanismes pré-G1 et post-réplication-G2 (Matsuda & Tobar, 1989). Cependant, la capacité de l'ovocyte à réparer l'ADN endommagé du spermatozoïde est limitée et lorsque le niveau de fragmentation de l'ADN est trop élevé cette capacité de réparation est dépassée. Il en résulterait des problèmes de fécondation, de développement embryonnaire (Jurisicova et al., 1996a, Jurisicova et al., 1996b, Sakkas et al., 1998) et des fausses couches spontanées précoces (Carrell et al., 2003). Il existe un grand nombre de références bibliographiques à ce sujet, dont les conclusions sont discutées. Cependant, les nombreuses études effectuées récemment à ce sujet s'accordent sur l'observation suivante : le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est plus élevé chez les patients inféconds que chez les sujets fertiles (Agarwal & Said, 2003, Saleh et al., 2003).

Le taux de fragmentation d'ADN des spermatozoïdes corrélé au taux de fécondation, à la qualité embryonnaire et au potentiel évolutif des embryons constitue un sujet de discussion très controversé. Les conclusions varient en fonction des études réalisées et de la technique appliquée. La technique la plus souvent utilisée dans ces études est la technique TUNEL. C'est pourquoi désormais nous ne prendrons comme référence que les résultats publiés d'après cette technique. Ainsi le seuil de fragmentation pour lequel il existe une corrélation négative avec le taux de fécondation dans la population de patients infertiles suivis en FIV et FIV-ICSI, varie de 11% pour Muratori (Muratori et al., 2003) à 41% pour Sergerie (Sergerie et al., 2005b). Ces populations sont étudiées par rapport à des volontaires témoins ou de patients fertiles, c'est à dire ayant déjà eu au moins un enfant. Pour ces derniers, le taux de fragmentation se situe entre 9 et 13%.

Si on se réfère à la revue de littérature de Sergerie (Sergerie et al., 2005a) traitant des différents travaux relatifs à la détermination d'un seuil de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes discriminant, selon les populations et les techniques étudiées, la moyenne des valeurs seuils obtenues par technique TUNEL chez des hommes infertiles est de 20%. Cependant, quelques publications remettent en cause ce paramètre difficile à interpréter, notamment celles de Tomlinson (Tomlinson et al., 2001), Morris (Morris et al., 2002), et Virro (Virro et al., 2004). Au cours de leurs études, il n'a pas été démontré de corrélation entre le taux de fragmentation et le taux de fécondation.

Outre le taux de fécondation, les études rapportent que le taux de fragmentation de l'ADN est ou n'est pas corrélé au développement du blastocyste, à la qualité embryonnaire et au potentiel évolutif de cet embryon. Ainsi, Seli (Seli et al., 2004) a rapporté qu'il existait une corrélation négative et de faible intensité entre le taux de fragmentation et le développement du blastocyste, suggérant que les anomalies de l'intégrité nucléaire des spermatozoïdes pourraient être responsables en partie seulement de la mauvaise qualité embryonnaire et de leur développement. Cependant ils enregistrent un taux de grossesse de 43% lorsque le taux de fragmentation est >20% versus 50% lorsque le taux est <20%. Cette différence n'est pas significative, ce qui montre que le taux de fragmentation est un paramètre difficile à interpréter. Dans une étude de Benchaïb (Benchaïb et al., 2003), lorsque le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes dépasse 10%, le taux d'obtention d'un

blastocyste à partir du stade embryonnaire est inférieur à 50%, alors qu'il est de 80% si le taux de fragmentation est en dessous de 10%. Par contre, aucune corrélation n'a été observée entre le taux de fragmentation et la qualité des embryons à J2. Ils expliquent ce résultat par le fait que le génome embryonnaire (impliquant l'ADN paternel) s'active à partir du stade 6-8 cellules, les stades les plus précoces étant donc essentiellement sous la dépendance des transcrits ovocytaires. Ainsi, à l'instant où le développement du *conceptus* est sous contrôle de son propre génome, il leur semble évident qu'il puisse y avoir arrêt du développement si celui-ci a été fécondé par un spermatozoïde avec un ADN endommagé. Concernant les relations entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et la qualité du *conceptus*, très peu de données sont actuellement disponibles. Il est supposé que si le *pronucleus* mâle est altéré, l'embryon n'atteindra pas le stade blastocyste. Toutefois, un ADN paternel faiblement endommagé pourrait permettre un développement préimplantatoire correct, mais, la présence de mutations dans le génome paternel aboutirait à une fausse couche tardive ou, conséquence plus grave encore, à un enfant porteur d'une anomalie génétique (Morris et al., 2002). Dans l'étude de Carrell (Carrell et al., 2003), il ressort que le taux de fragmentation de l'ADN est significativement plus élevé dans le groupe des fausses couches spontanées précoces à répétition que dans le groupe témoin représenté par des donneurs de sperme dont la fertilité a été prouvée. Devant l'ensemble de ces données, il nous est paru important de réaliser notre propre étude afin de savoir si la détermination du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes présente un intérêt pour les patients infertiles, et dans l'affirmative quelle serait le seuil critique et les domaines d'application. La technique TUNEL étant une référence pour la détermination du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, nous avons choisi de la mettre en application au sein du laboratoire de Biologie de la Reproduction pour évaluer le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes de patients infertiles pris en charge en FIV ou FIV/ICSI.

3.MATERIELS ET METHODES

3.1 Les patients, critères d'inclusion/exclusion

Afin de mettre en application la technique TUNEL, nous avons sélectionné des patients infertiles suivis en FIV par le service de Médecine et de Biologie de la Reproduction du CHU de Nantes. Le seul critère de sélection pour l'inclusion des hommes participant à cette étude est la numération des spermatozoïdes après capacitation. Au début de notre étude, nous avons établi que le nombre de spermatozoïdes à déposer au centre de chaque lame devait être compris entre 5 000 et 200 000. Or, cet intervalle s'est avéré trop large et du même coup la lecture des lames trop hétérogène. Dans un souci de reproductibilité et répétabilité, nous avons réduit le nombre de spermatozoïdes à déposer sur chaque lame entre 50000 et 100000. Le volume de sperme capacité à déposer devant être compris entre 5 et 20 μ L, la numération de la fraction de capacitation ne doit, par conséquent, pas être inférieure à 6 millions de spermatozoïdes/mL, ni supérieure à 20 millions de spermatozoïdes/mL. De ce fait, les patients pour lesquels la fraction de capacitation impose le recours à l'ICSI, sont difficilement inclus dans cette étude. Nous recrutons donc un nombre de patients bénéficiant de la FIV conventionnelle (n=89) considérablement plus important que le nombre de patients bénéficiant de l'ICSI (n=21). Finalement, pour la réalisation de notre étude, nous avons pu inclure 110 patients, sur une période 16 mois (octobre 2004 à février 2006).

3.2 Les prélèvements

Nous avons travaillé à partir du sperme de patients recueilli le matin même de la ponction ovocytaire de leur conjointe, dans le cadre d'une tentative de FIV conventionnelle ou de FIV-ICSI. Quelques microlitres de sperme capacité (5 à 10 μ L) sont déposés au centre d'une lame dégraissée, au niveau d'un cercle d'un centimètre carré de surface, et étalés grâce à la pointe d'un cône. Pour chaque patient, 2 lames sont préparées. Elles sont identifiées par le nom et le prénom de la conjointe. Figurent également la date du dépôt, le rang de la FIV et le type de FIV (conventionnelle ou ICSI). Les lames sont ensuite séchées 24 heures à température ambiante. Après 24 heures, le couple de lames est emballé dos à dos dans du papier aluminium. Le nom et le prénom de la patiente doivent également figurer sur le papier aluminium. Les lames sont ensuite stockées à -20°C , jusqu'à réalisation de la technique.

3.3 La technique TUNEL

3.3.1 Principe de la technique TUNEL

Le principe de la technique est basé sur la génération de groupements hydroxy-terminaux (3'OH) dans l'ADN lors de fragmentation. Les groupements sont alors facilement identifiables. La technique TUNEL utilise l'activité spécifique de la Terminal desoxynucleotidyl transférase (Tdt) pour incorporer des nucléotides marqués aux extrémités 3'OH des fragments d'ADN simple et double-brins. Il s'agit de désoxy-Uridine-TriPhosphate (dUTP) marqués à la digoxigénine. Le signal est ensuite obtenu par l'addition d'un anticorps anti-digoxigénine marqué par une peroxydase, puis par l'ajout d'un substrat chromogène, la DiAminoBenzidine (DAB) réduite incolore en présence de peroxyde de dihydrogène (H_2O_2). La peroxydase couplée à l'anticorps va agir sur son substrat H_2O_2 , libérant de l'oxygène réactif qui induit l'oxydation du DAB en un produit coloré en brun. Cette coloration brune se répartit sur toute la tête du spermatozoïde. Elle est donc facilement repérable au microscope optique. Cette coloration brune est d'autant plus intense que le niveau de fragmentation de l'ADN est élevé. Pour mieux distinguer les spermatozoïdes avec une tête brune, on réalise une contre coloration par l'hématoxyline. Les spermatozoïdes non fragmentés apparaissent alors en bleu-gris (**figure 15**).

Il existe un autre mode de révélation de la technique utilisant l'acridine orange et donc nécessitant une lecture au microscope à fluorescence, voire par cytométrie en flux. Dans ce cas, la reproductibilité et la répétabilité des résultats seraient potentialisés. Cependant pour des raisons d'investissements financiers importants nous avons choisi la méthode de révélation impliquant une lecture au microscope optique. Le coût d'achat du coffret de réactifs que nous avons choisi n'est cependant pas négligeable. Il est de 570 € HT, sachant qu'il permet la réalisation d'environ 50 réactions (soit 50 lames), le prix revient pour 1 réaction (1 lame) sera de 112 €.

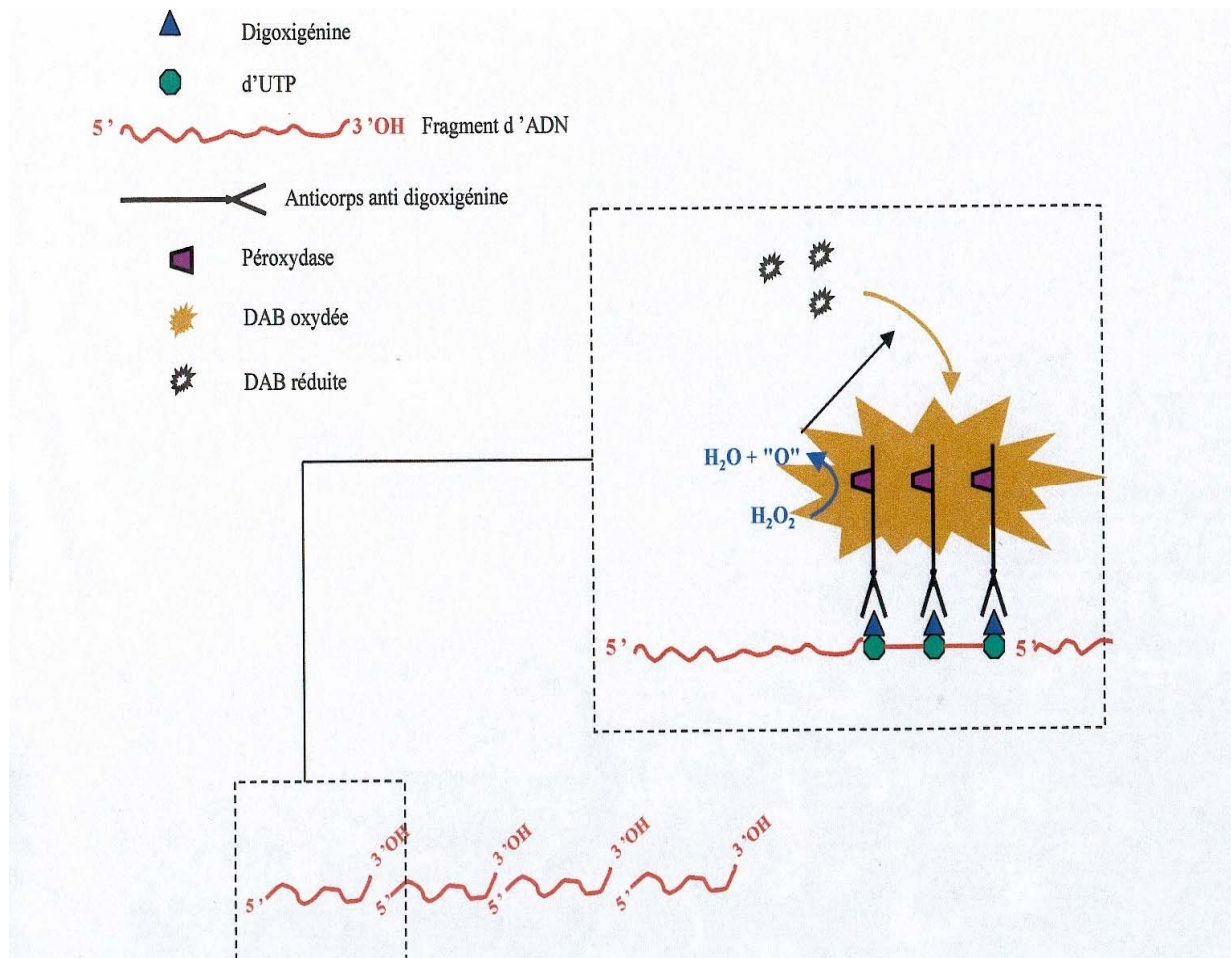


Figure 15: schéma du principe de la technique TUNEL

3.3.2 réalisation de la technique

Pour la mise en application de notre étude, nous avons choisi le kit ApoptoTag®, commercialisé par le laboratoire Q-biogene.

Ce kit comprend :

le tampon d'équilibration nécessaire à ajuster le pH ;

l'enzyme (Terminal desoxynucleotidyl transferase ou Tdt), conservée dans du glycérol à – 20°C, dont la préparation est extemporanée par dilution au 1/3 dans le tampon de réaction ;

le tampon de réaction qui comprend les nucléotides marqués (dUTP marqués à la digoxigénine), également conservé à – 20°C ;

la solution d'arrêt, Stop Reaction à diluée au 1/35^{ème} ;

l'anticorps anti-digoxigénine marqué à la peroxydase, conservé à +4°C ;

la DiAminoBenzidine ou DAB substrat, conservée à +4°C et à l'obscurité, dont la préparation est extemporanée par dilution au 1/25^{ème} dans le DAB tampon de dilution qui comprend le peroxyde de dihydrogène, substrat de la peroxydase.

Les réactifs nécessaires à la réaction non fournis par le kit sont :

la solution de fixation obtenue par un mélange méthanol/acide acétique glacial en proportion 3/4 et 1/4 ;

l'eau oxygénée 3% utilisée au cours de l'étape de perméabilisation (différente de l'eau oxygénée de la révélation). Son rôle est de neutraliser les endoperoxydases intracellulaires, sans quoi on obtiendrait une coloration brune pour tous les spermatozoïdes par oxydation du DAB par celles-ci ;

les solutions tampons utilisées pour le rinçage entre chaque étape, il s'agit de PBS 1X, préparé à partir de PBNS 10X par dilution au 1/10^{ème} dans de l'eau distillée ;

la solution de perméabilisation de PBS triton 1X, préparée par dilution de Triton 100X dans du PBS 1X ;

l'hématoxyline de Harris nécessaire pour la contre-coloration.

Le mode opératoire de l'étude de la fragmentation de l'ADN spermatique selon la technique TUNEL (*annexe 4*) est résumé dans le tableau ci-après (**Tableau IV**).

Tableau IV étapes de la technique TUNEL

	Etapes
Fixation des lames	Plonger les lames 20 min dans le mélange méthanol/acide acétique ; Egoutter, sécher ;
Perméabilisation des cellules	Plonger les lames 5 min dans le PBS Triton
Saturation des endoperoxydases cellulaires	Rincer par le PBS 1X ; Ajouter l'H ₂ O ₂ 3% pendant 10 min ;
Elongation de l'ADN	Recouvrir les lames de tampon d'équilibration, pendant 10 sec ; Ajouter la solution de Tdt diluée au 1/3 dans le tampon de réaction, recouvrir les lames d'une lamelle pendant 1 heure à 37°C ; Après 1 heure, arrêter la réaction par la Stop Reaction (15 min) ;
Révélation de l'élongation	Recouvrir les lames par l'Anticorps anti digoxigénine pendant 30 min à l'obscurité Rincer par du PBS 1X ;
Révélation des sites de marquage	Recouvrir les lames par le DAB substrat dilué dans le tampon DAB, pendant 10 min à l'obscurité ; Rincer à l'eau ;
Contre-coloration	Recouvrir les lames d'hématoxyline de Harris, pendant 3 min ; Rincer à l'eau ;
Montage	Déposer une goutte de liquide de montage Déposer une lamelle ;
Lecture	Lecture au microscope optique à immersion objectif x100

4. RESULTATS

4.1 Présentation des résultats

La lecture des lames est relativement simple. Les spermatozoïdes à tête marron sont classés parmi les spermatozoïdes à ADN fragmenté, tandis que les spermatozoïdes à tête gris-bleu sont classés parmi les spermatozoïdes à ADN non fragmenté. L'image observée au microscope optique, grossissement x 100 est la suivante (**figure 16**).

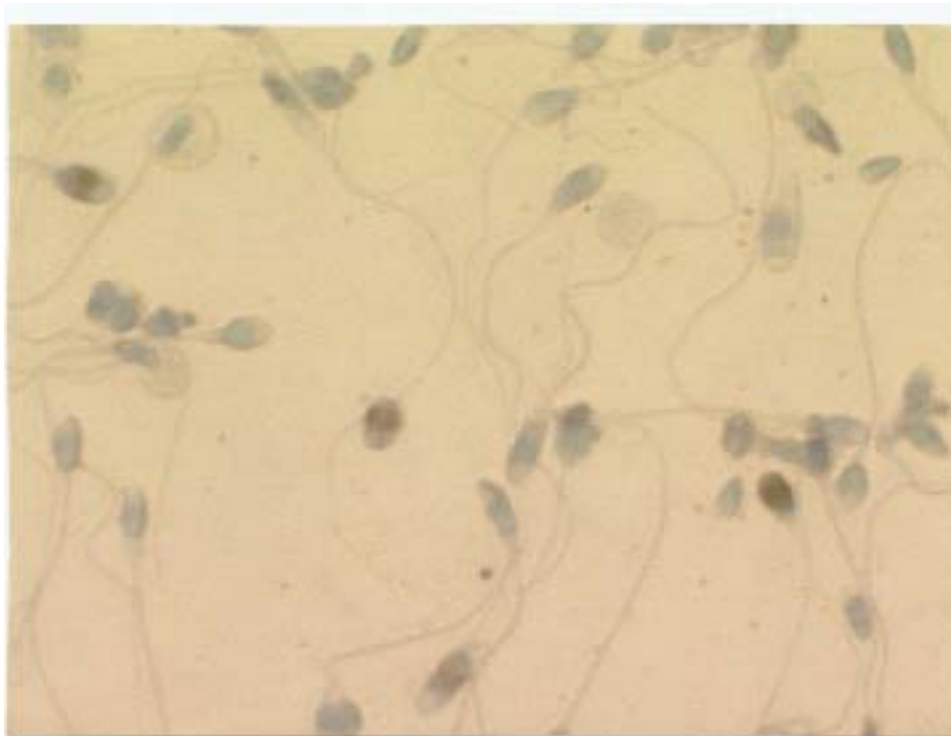


Figure 16 : Photographie d'un frottis de sperme capacité après coloration ApotoTag (x100)

Nous avons commencé la mise en application de la technique TUNEL en octobre 2004. A partir de fin mai 2005, nous avons créé différentes catégories d'intensité de la coloration marron. Les spermatozoïdes sont alors classés selon les 4 catégories suivantes :

- gris/bleu (spermatozoïdes non fragmentés)
- marron clair (spermatozoïdes peu fragmentés)
- marron moyen (spermatozoïdes moyennement fragmentés)
- marron soutenu (spermatozoïdes fortement fragmentés).

Le résultat est rendu sous forme d'un pourcentage de spermatozoïdes fragmentés ou non pour chacune des catégories, après lecture d'au moins 200, de préférence 500,

spermatozoïdes par lame. Toutefois, cette appréciation des couleurs est assez subjective et peut varier d'un lecteur à l'autre, c'est pourquoi une seule personne effectuera la lecture des lames au cours de l'étude, dans un souci de reproductibilité et répétabilité. Par ailleurs, se référant aux nombreuses publications parues dans la littérature scientifique concernant l'existence d'une corrélation entre le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et la qualité embryonnaire puis le potentiel évolutif de l'embryon, pour chaque patient inclus dans notre étude, nous renseignons *a posteriori* : le pourcentage d'ovocytes fécondés par rapport aux ovocytes inséminés, le nombre d'embryons obtenus, la qualité embryonnaire au deuxième jour de culture *in vitro* (nombre de blastomères, régularité des cellules, présence ou non de fragments cellulaires), le nombre de blastocystes obtenus, le nombre d'embryons transférés, le nombre d'embryons congelés, l'issue de grossesse, afin de savoir s'ils sont effectivement corrélés au taux de fragmentation. Nous renseignons également l'âge de la patiente. Il nous a également semblé important de rapporter le taux de fragmentation obtenu pour chaque patient à l'âge de ce patient, et aux paramètres du spermogramme et du spermocytogramme (numération, mobilité, morphologie). L'étude s'est finalement déroulée pendant 16 mois de sorte que notre effectif final atteigne le nombre de 110 patients. Les résultats de fragmentation obtenus par la technique TUNEL et les renseignements correspondant aux 2 membres du couple sont répertoriés dans un tableau présenté en **annexe 5**. L'essentiel des paramètres à partir desquels nous travaillerons par la suite figure dans le tableau ci-après (**Tableau V**).

Tableau V : Résultats de l'étude TUNEL

	Age patiente	% Fragmentation	ovocytes fécondés/inséminés	Nb embryons obtenus	Nb embryons transférés	Qualité embryonnaire à J2	Nb blastocystes obtenus	Issue de Grossesse	Rmq
1	37	16	9/12	8	3	reg	0	0	
2	32	39	7/16	5	2	irreg	0	1	
3	27	57	10/14	10	2	irreg	0	0	GEU
4	40	39	4/4	3	3	irreg	0	0	
5	32	40	6/17	5	3	reg	0	0	bH+
6	39	31	1/5	0	échec	0	0	0	
7	26	37	2/4	1	1	reg	0	0	bH+
8	33	<1	2/9	2	2	reg	0	0	
9	34	<1	13/16	12	2	reg	0	0	FCSP
10	37	9	9/15	9	2	reg	0	0	
11	32	39	2/8	2	2	reg/irreg	0	0	
12	28	37	5/8	5	2	irreg	0	1	
13	33	68	6/15	6	3	irreg	0	0	
14	38	48	6/16	6	3	irreg	0	1	
15	28	19	4/4	4	2	reg	0	0	
16	37	34	7/8	7	1	irreg	0	0	
17	32	50	7/11	6	2	reg	0	0	bH+
18	38	51	7/11	7	3	irreg	0	0	
19	36	32	5/5	4	2	reg	0	0	
20	40	28	3/3	3	3	reg	0	0	
21	25	24	3/3	3	2	reg	0	0	
22	37	9	2/4	2	2	reg/irreg	0	0	bH+
23	32	34	2/2	2	2	irreg	0	0	
24	34	48	11/15	11	2	irreg	0	0	
25	31	32	9/11	9	3	reg/irreg	0	1	
26	39	45	2/7	2	2	reg/irreg	0	0	bH+
27	33	51	13/15	13	2	reg/irreg	0	1	

28	34	44	4/7	4	2	irreg	0	0	
29	32	36	7/15	7	2	reg	0	0	FCSP
30	31	8	3/6	3	2	irreg	0	0	
31	27	12	6/9	6	2	reg	0	0	
32	29	18	5/10	5	2	reg	0	0	
33	30	21	12/15	12	échec	irreg	0	0	
34	43	42	3/5	3	3	irreg	0	1	
35	28	8	2/4	2	2	reg	0	0	
36	37	36	2/3	2	2	reg	0	0	
37	37	19	8/8	8	2	reg	0	0	
38	34	34	11/16	11	3	reg	0	1	
39	34	20	6/9	6	2	irreg	0	0	FCSP
40	35	2	3/6	3	2	reg/irreg	0	1	
41	30	11	7/9	5	2	reg/irreg	0	1	
42	40	24	10/13	10	2	reg	0	1	
43	35	30	2/4	2	2	irreg	0	0	
44	29	49	2/5	2	2	reg	0	0	
45	37	35	11/14	11	3	reg	0	1	
46	34	38	11/15	11	2	reg	0	1	
47	32	20	6/7	6	2	reg	0	0	
48	29	62	2/10	2	2	irreg	0	0	
49	33	33	2/11	2	2	irreg	0	0	
50	36	22	10/12	10	2	reg	0	0	
51	33	18	5/11	5	2	reg/irreg	0	1	
52	33	37	7/11	7	2	reg	0	1	
		%	ovocytes	Nb	Nb	Qualité	Nb blasto-	Issue de	

reg : embryon à 4, 6 ou 8 blastomères réguliers, sans fragments cellulaires
issue de grossesse 0 : pas de grossesse
 grossesse à terme
GEU : grossesse extra-utérine
FCSP : fausse couche

56	32	14	10/10	10	2	reg	0	0	
57	38	6	1/8	1	1	reg	0	0	
58	34	13	11/12	11	2	reg	0	0	
59	37	30	2/2	2	2	reg	0	0	
60	31	24	10/11	10	2	reg	1	0	
61	34	18	9/9	9	2	reg	0	1	
62	33	36	6/13	5	2	reg	0	0	
63	31	<1	0/1	0	0	0	0	0	
64	33	5	4/14	3	2	reg	1	0	
65	31	3	11/16	11	2	reg/irreg	1	0	
66	37	<1	12/13	11	2	reg	0	0	
67	32	<1	9/14	8	3	irreg	0	0	
68	30	40	10/11	9	2	irreg	0	0	
69	33	49	3/5	3	2	reg/irreg	0	1	
70	27	49	9/18	9	2	reg	0	0	
71	33	39	3/5	3	2	irreg	0	0	
72	30	<1	6/8	6	2	reg	0	0	
73	36	47	6/9	6	2	reg	0	0	bH+
74	30	24	5/23	5	2	reg	0	0	
75	37	34	8/9	8	2	reg	0	0	bH+
76	35	38	4/4	4	2	0	0	0	
77	30	25	15/16	15	2	0	0	0	
78	38	12	0/3	0	0	reg	2	0	bH+
79	34	20	11/23	11	0	reg	0	0	bH+
80	40	18	11/14	11	2	reg	0	0	
81	40	30	3/10	3	3	reg/irreg	0	0	
82	30	20	6/8	5	2	reg	0	1	
83	29	13	13/15	13	2	reg	0	0	
84	31	26	2/4	2	2	reg	0	0	

85	37	21	16/21	15	2	irreg	0	1	
86	35	14	10/20	10	2	reg	0	0	
87	36	28	11/15	11	2	reg	4	0	
88	28	34	12/17	12	2	reg	0	0	bH+
89	27	15	8/10	8	1	reg	0	1	
90	31	32	9/15	9	2	reg	0	0	
91	28	59	12/17	12	2	reg	0	1	
92	38	22	9/14	3	2	reg	1	0	
93	34	25	7/21	7	2	irreg	1	0	bH+
94	28	28	3/5	3	2	reg	1	0	
95	33	24	1/3	1	1	reg	0	0	
96	34	18	0/9	0	0	0	0	0	
97	35	31	4/5	2	2	reg/irreg	0	1	
98	33	17	0/4	0	0	0	0	0	
99	38	20	4/12	4	3	irreg	0	0	
100	32	19	8/10	8	2	reg	0	1	
101	33	<1	3/10	3	3	irreg	0	1	
102	37	<1	7/12	7	2	reg	0	0	bH+
103	31	50	9/13	9	1	reg/irreg	1	0	
104	28	26	16/17	16	2	reg	0	0	
105	31	17	8/11	8	2	irreg	0	1	
106	44	17	10/20	10	2	reg	0	0	
107	27	14	4/8	4	2	irreg	0	1	
108	34	15	10/12	10	2	reg	0	0	
109	25	24	6/7	6	2	reg	0	1	
110	36	36	3/4	3	2	reg	0	0	

reg : embryon à 4, 6 ou 8 blastomères réguliers, sans fragments cellulaires
issue de grossesse 0 : pas de grossesse
grossesse à terme
GEU : grossesse extra-utérine
FCSP : fausse couche

Partie1 : Analyse des 44 premiers résultats

Après 6 mois de réalisation de la technique TUNEL, soit les 44 premiers patients inclus, nous nous avons réalisé une analyse intermédiaire. Dans un premier temps, afin d'exploiter ces premiers résultats, nous utilisons, à l'image des publications parues à ce sujet (Sergerie et al., 2005a), (Guerin & Benchaib, 2004), un seuil de fragmentation de l'ADN spermatique de 20%. Nous rapportons ensuite ce taux de fragmentation de 20% à un événement : la survenue d'une grossesse. Ces 44 premiers résultats sont rappelés dans le **tableau VI**.

Tableau VI : Résultats de l'analyse intermédiaire

	Effectif total	Effectif lorsque le taux de fragmentation <20%	Taux de fragmentation >20%	
			Effectif	Dispersion des valeurs >20% ; moyenne
Grossesses évolutives	10	2	8	[22-51] ;31,5

Grossesses non évolutives	9	3	6	[30-57] ;39
Pas de grossesse	25	9	16	[21-68] ;38

Au vue de ces premiers résultats, il semblerait que, quelle que soit l'issue de la fécondation *in vitro* (grossesse évolutive, non évolutive ou pas de grossesse), il n'y ait pas de différence significative en fonction du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Par ailleurs, pour interpréter ces résultats, il est important de considérer l'ensembles des données à la fois masculines et féminines. En effet, au cours de cette analyse nous n'avons pas évoqué la pathologie qui a amené le couple à avoir recours à la fécondation *in vitro*, or elle peut être masculine (OATS), féminine (pathologie tubaire) mixte, ou inexpliquée et de ce fait influencer directement sur les résultats. Concernant la cohorte féminine les données dont on dispose sont assez uniformes (âge moyen 33,3 ans ; écart-type 3,8). Une seconde analyse des résultats en fonction du recours à la FIV conventionnelle ou FIV-ICSI est alors proposée. Nous répertorions pour les 2 groupes FIV-C et FIV-ICSI, l'issue de la grossesse (évolutive, non évolutive, ou pas de grossesse) et les taux de fragmentation de l'ADN >20%. Nous comparons les 2 groupes FIV et FIV-ICSI, à savoir est-ce que les événements testés sont significativement plus représentés dans un groupe que dans l'autre, puis dans un second temps, lorsque le taux de fragmentation est supérieur à 20%, la distribution de ces événements varie-t-elle ? Les résultats sont présentés sous forme de tableau (**Tableau VII**)

Tableau VII : Comparaison des résultats FIV-C versus FIV-ICSI

	FIV-C		FIV-ICSI		p	
	Effectif total	Effectif lorsque le taux de fragmentation >20%	Effectif total	Effectif lorsque le taux de fragmentation >20%	Effectif total	Taux >20%
	18	13/18 (72%)	26	17/26(65%)		0.65
Grossesse évolutive (n=10)	3	3/3	7	5/7	0.45	0.30
Grossesse non évolutive (n=9)	5	3/5	4	3/4	0.60	0.28
Pas de grossesse (n=25)	10	7/10	15	9/15	0.80	0.65

Nous ne constatons pas de différences significatives entre les 2 groupes. On pourrait supposer que la fragmentation affecte les propriétés fonctionnelles du spermatozoïde. De ce fait, lors de la FIV-C, il s'opèrerait une sélection parmi les spermatozoïdes les plus aptes à la fécondation par opposition à la FIV-ICSI où le spermatozoïde inséminé est choisi parmi un

nombre limité de spermatozoïdes fonctionnels. Or d'après nos résultats, il n'y aurait pas de différence entre les 2 techniques de fécondation *in vitro*.

Finalement, devant ces premiers résultats assez divergents il nous paraît évident que notre effectif est insuffisant pour apporter des conclusions. Nous poursuivons donc l'étude jusqu'à l'inclusion de 110 patients. Cependant nous avons du modifier les conditions de recrutement des patients. En effet comme il l'est expliqué au cours du paragraphe « patients, critères d'inclusion », il était impératif de réduire le nombre de spermatozoïdes à déposer sur chaque lame. Le sperme des hommes ayant recours à la FIV-ICSI n'a été que rarement sélectionné au cours de la seconde partie de l'étude (seulement 3). Les hypothèses émises précédemment au sujet d'une différence ou non entre le groupe FIV-C et ICSI ne pourront donc pas être vérifiées. Nous recentrons donc l'objet de notre travail sur les conséquences de la fécondation *in vitro* par des spermatozoïdes à ADN significativement fragmenté.

Nous nous sommes interrogés sur plusieurs points. Le premier concerne la valeur seuil de la fragmentation fixée à 20%. Afin de nous assurer du caractère discriminant ou non de cette valeur seuil, nous poursuivons l'étude jusqu'à l'obtention d'un nombre satisfaisant de données permettant de tester cette valeur de 20% et éventuellement de déterminer notre propre seuil discriminant dans le cas où celui de 20% ne serait pas satisfaisant.

Par ailleurs, cette valeur seuil possède-t-elle le même pouvoir prédictif en fonction de l'événement auquel elle est corrélée ? Nous tenterons de faire cette distinction.

Nous réfléchissons également à l'intérêt d'une catégorisation de l'intensité de la coloration brune, afin de savoir si le niveau de fragmentation est un critère pertinent. En effet, plus l'ADN est fragmenté, plus la coloration marron est soutenue, et plus les conséquences des dommages génomiques devraient être évidentes. Nous n'avons pas retrouvé, dans la littérature, d'articles faisant référence à ces différences de l'intensité de la coloration brune. L'analyse de nos résultats va donc consister dans un premier temps à définir s'il existe une relation entre le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et les conséquences d'une fécondation par un spermatozoïde dont le taux de fragmentation serait supérieur au seuil critique d'une part, et les caractéristiques masculines (âge, paramètres du sperme) d'autre part. Puis dans un second temps, nous tenterons de déterminer s'il existe véritablement un seuil nous permettant d'exploiter les résultats obtenus, quelle est la valeur de ce seuil, et quel est ou quels sont le ou les événements le plus fortement corrélés à ce taux. Par ailleurs, nous analyserons l'intérêt d'une distinction entre les différentes catégories de coloration brune des spermatozoïdes.

Partie 2 : Etude de relation entre le taux de fragmentation et divers événements

Afin de tester la relation qui peut exister entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et divers événements, c'est à dire entre une variable quantitative « taux de fragmentation » et une variable qualitative « événement », nous avons défini au préalable des intervalles de taux de fragmentation pour permettre l'exploitation des résultats. Lorsqu'on se réfère aux publications parues à ce sujet, il semblerait qu'il existe une zone critique pour ce taux de fragmentation entre 20 et 35%. De ce fait, nous définissons 5 catégories : de 0 à 20%, de 21 à 25%, de 26 à 30%, de 31 à 35% et >35%. Pour chacune de ces catégories est calculé l'effectif lui correspondant et un effectif associé à l'événement testé, à savoir la fécondation des ovocytes, l'obtention d'embryons, la qualité embryonnaire, l'issue de grossesse, mais aussi l'âge du patient et les paramètres de son sperme. En fait, plutôt que la survenue d'un événement positif, nous testons la survenue d'un événement négatif, dans la mesure où le taux de fragmentation serait un facteur de mauvais pronostic pour la survenue de l'événement. Les événements testés sont donc « <50 % de fécondation des ovocytes inséminés », « absence de développement d'un blastocyste », « mauvaise qualité

embryonnaire à J2 », « arrêt de la grossesse », « âge de l'homme » et « altérations des paramètres du sperme ». Ensuite, nous testons l'hypothèse nulle suivante : au risque d'erreur 5%, la distribution de ces événements négatifs n'est pas significativement différente en fonction des catégories de taux de fragmentation de l'ADN spermatique. Pour réaliser ce test statistique nous utilisons le test du *Chi deux*.

1. Taux de fragmentation et fécondation des ovocytes

Nous dénombrons, pour chaque catégorie de taux de fragmentation de l'ADN spermatique, les effectifs pour lesquels le pourcentage d'ovocytes fécondés par rapport aux ovocytes inséminés est inférieur à 50%, et nous en déduisons l'effectif correspondant à l'événement contraire, afin d'établir le tableau de contingence 5x2 pour le calcul du *Chi deux*. Les résultats sont répertoriés dans le tableau ci-après (**Tableau VIII**).

Tableau VIII : Taux de fragmentation et fécondation des ovocytes

%fragmentation	Effectif associé pour chaque catégorie	Effectif observé pour « ≤ à 50% d'ovocytes fécondés »	Effectif associé à l'événement contraire
0 à 20%	43	18	28
21 à 25%	12	3	9
26 à 30%	8	3	5
31 à 35%	13	2	11
>35%	34	12	22
Total effectif	110	38	72

Par le test du *Chi deux*, au risque de 5% et pour 4 degrés de liberté $((5-1) \times (2-1))$, nous obtenons une valeur **p=0,45** ($p > 0,05$), ce qui signifie que l'hypothèse H_0 selon laquelle la différence entre l'effectif théorique et l'effectif observé n'est pas significative, est retenue. En d'autres termes, quel que soit le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, la fécondation des ovocytes inséminés est indépendante de ce taux. Toutefois, un tel test est difficile à interpréter car plus on réduit les effectifs observés en créant des divisions de l'effectif de départ, ici 5 catégories, plus le test perd de sa puissance. De plus, dans le cas où $p < 0,05$ témoignerait d'une différence significative en fonction du taux de fragmentation, il ne serait pas possible de donner la tendance de ce test, à savoir si cette différence s'effectue selon un taux de fragmentation croissant ou décroissant. C'est pourquoi nous fixons 4 seuils de taux de fragmentation de l'ADN correspondant à la borne supérieure des intervalles définis précédemment : 20, 25, 30 et 35%, et nous testons l'événement « taux de fécondation des ovocytes <50% » *versus* événement contraire pour ces 4 taux. Nous obtenons les résultats résumés dans le tableau suivant (**Tableau IX**).

Tableau IX : Taux de fragmentation et fécondation des ovocytes

% fragmentation	effectif pour l'événement " ≤ à 50% d'ovocytes fécondés "	effectif pour l'événement contraire	Total des effectifs	Test du X^2 Valeur de p
-----------------	---	-------------------------------------	---------------------	------------------------------

0 à 20%	18	25	43	p=0,19
>20%	20	47	67	
Total	38	72	110	
0 à 25%	21	34	55	p=0,55
>25%	17	38	55	
Total	38	72	110	
0 à 30%	24	39	63	p=0,48
>30%	14	33	47	
Total	38	72	110	
0 à 35%	26	50	76	p=0,44
>35%	12	22	34	
Total	38	72	110	

D'après les résultats figurant dans le tableau ci-dessus, nous ne constatons pour aucune des situations de différence significative associée à l'événement « moins de 50% des ovocytes inséminés fécondés ». Il semblerait donc qu'il n'existe pas de relation entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et la fécondation des ovocytes inséminés.

Par la suite, pour tous les autres événements que nous allons tester, nous procéderons de la même manière, à savoir un premier test du *Chi deux* permettant la comparaison des 5 catégories de taux de fragmentation de l'ADN, puis un test du Chi deux permettant de comparer 2 à 2 les effectifs en fonction du seuil de fragmentation déterminé (20-25-30-ou>35).

2 Taux de fragmentation et blastocystes

L'effectif total de 6 blastocystes pour 110 patients inclus, ne permet pas la réalisation du test statistique. Il est important de rappeler que dans la majorité des cas les embryons sont transférés avant le stade blastocyste, il est donc difficile de savoir si le taux de fragmentation est corrélé au développement de l'embryon jusqu'au stade blastocyste puisque ce stade n'est que rarement observé *in vitro*.

3. Taux de fragmentation et qualité embryonnaire

Pour déterminer s'il existe une relation entre le taux de fragmentation et une mauvaise qualité embryonnaire, nous avons dénombré le nombre de cas où après 2 jours de culture des ovocytes inséminés, les embryons obtenus étaient irréguliers c'est à dire que l'aspect des blastomères était irrégulier et que l'on observait la présence de fragments cellulaires. Les résultats figurent dans les **tableaux X et XI**.

Tableau X : Taux de fragmentation et qualité embryonnaire à J2

% fragmentation	Effectif associé pour chaque catégorie	Effectif observé pour l'événement "embryon irrégulier"	Effectif associé à l'événement contraire
0 à 20%	43	15	28
21 à 25%	12	4	8
26 à 30%	8	3	5
31 à 35%	13	7	6
>35%	34	20	14

Total effectif	110	49	61
----------------	-----	----	----

Tableau XI : Taux de fragmentation et qualité embryonnaire à J2

% fragmentation	effectif pour l'événement "embryon irrégulier"	effectif pour l'événement contraire	Total des effectifs	Test du X ² Valeur de p
0 à 20%	15	28	43	p=0,15
>20%	34	33	67	
Total	49	61	110	
0 à 25%	19	36	55	p=0,055
>25%	30	25	55	
Total	49	61	110	
0 à 30%	22	41	63	p=0,03
>30%	27	20	47	
Total	49	61	110	
0 à 35%	29	47	76	p=0,07
>35%	20	14	34	
Total	49	61	110	

Par le test du *Chi deux*, au risque de 5% et pour 4 degrés de liberté ((5-1)x(2-1)), nous obtenons une valeur **p=0,78** (p>0,05). L'hypothèse H0 selon laquelle il n'existe pas de différence entre les catégories testées est donc retenue. Lorsque nous réalisons de nouveau le test du *Chi deux* en réduisant le nombre de catégories de taux de fragmentation à 2 afin d'augmenter la puissance statistique du test, nous constatons qu'il existe une différence significative entre les 2 cohortes « taux de fragmentation <30% » et « taux de fragmentation >30% » pour l'événement « embryon irrégulier ». En effet, p<0.05 permet d'accepter au risque 5% l'hypothèse selon laquelle la mauvaise qualité embryonnaire obtenue au deuxième jour de culture *in vitro* est significativement plus importante lorsque le taux de fragmentation dépasse 30%.

4. Taux de fragmentation et issue de grossesse

Le dernier critère que nous voulions tester en rapport avec les conséquences d'une fécondation par un spermatozoïde dont le taux de fragmentation dépasserait une valeur seuil est l'issue d'une telle fécondation, à savoir y a-t-il grossesse et dans l'affirmative, comment évolue-t-elle ? Dans ce cadre, nous distinguons 2 événements : l'absence de début de grossesse et l'arrêt précoce d'une grossesse représenté d'une part par la grossesse biochimique caractérisée par un taux de β hCG sanguin détectable sans activité cardiaque décelée à l'échographie, et d'autre part par la fausse couche spontanée précoce (FCSP). Nous dénombrons pour chaque catégorie de taux de fragmentation de l'ADN les effectifs correspondant aux 2 événements (**Tableau XII à XV**). Nous analyserons séparément les résultats correspondant à l'événement « pas de grossesse » de ceux correspondant à l'événement « arrêt du développement embryonnaire ».

4.1 Taux de fragmentation et absence de grossesse

Tableau XII : Taux de fragmentation et absence de grossesse

% fragmentation	Effectif associé à chaque catégorie	Effectif observé pour l'événement "pas de grossesse"	Effectif associé à l'événement contraire
0 à 20%	43	33	10
21 à 25%	12	9	3
26 à 30%	8	8	0
31 à 35%	13	9	4
>35%	34	23	11
Total effectif	110	82	28

Tableau XIII : Taux de fragmentation et absence de grossesse

% fragmentation	effectif pour l'événement "pas de grossesse"	effectif pour l'événement contraire	Total des effectifs	Test du X ² Valeur de p
0 à 20%	33	10	43	p=0,20
>20%	49	28	67	
Total	82	28	110	
0 à 25%	42	13	55	p=0,83
>25%	40	15	55	
Total	82	28	110	
0 à 30%	50	13	63	p=0,26
>30%	32	15	47	
Total	82	28	110	
0 à 35%	59	17	76	p=0,38
>35%	23	11	34	
Total	82	28	110	

Lorsque la dépendance des variables « taux de fragmentation » et l'événement « pas de grossesse » est testée au moyen du test du *Chi deux*, au risque 5% et pour 4 ddl on obtient une valeur **p=0,42**. L'hypothèse d'une différence significative en fonction du taux de fragmentation n'est donc pas retenue. Par comparaison des effectifs 2 à 2 en fonction du seuil de fragmentation, nous rejetons également l'hypothèse de l'existence d'une différence significative pour l'événement « pas de grossesse » en fonction du taux de fragmentation de l'ADN spermatique.

4.2 Taux de fragmentation et arrêt de la grossesse

Tableau XIV : Taux de fragmentation et arrêt de grossesse

% fragmentation	Effectif associé à chaque catégorie	Effectif observé pour l'événement "arrêt de grossesse"	Effectif associé à l'événement contraire
0 à 20%	43	6	37
21 à 25%	12	1	11
26 à 30%	8	0	8
31 à 35%	13	2	11
>35%	34	7	27
Total effectif	110	16	94

Tableau XV : Taux de fragmentation et arrêt de grossesse

% fragmentation	effectif pour l'événement "arrêt de grossesse"	effectif pour l'événement contraire	Total des effectifs	Test du X ² Valeur de p
0 à 20%	6	37	43	p=0,89
>20%	10	57	67	
Total	16	94	110	
0 à 25%	7	48	55	p=0,78
>25%	9	46	55	
Total	16	94	110	
0 à 30%	7	56	63	p=0,36
>30%	9	38	47	
Total	16	94	110	
0 à 35%	9	67	76	p=0,37
>35%	7	27	34	
Total	16	94	110	

La valeur **p=0,60** obtenue d'après le test du *Chi deux* pour l'événement « arrêt précoce de la grossesse » est en faveur de l'absence de différence significative de la survenue de cet événement en fonction du taux de fragmentation. L'analyse 2 à 2 de chacune des catégories de taux de fragmentation ne mettra en évidence aucune relation entre le taux de fragmentation et cet événement.

5. Taux de fragmentation et paramètres du spermogramme

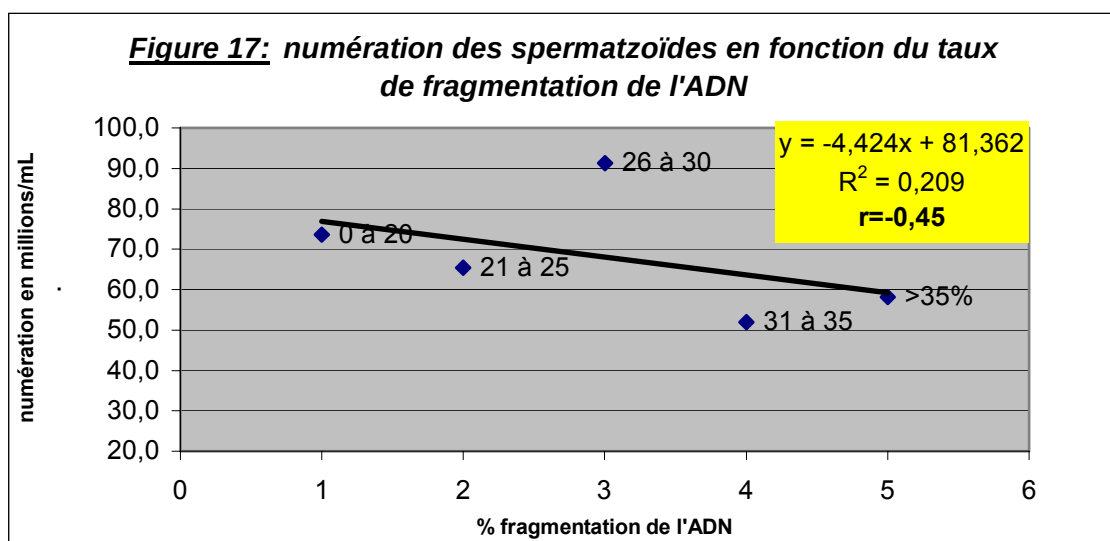
Outre les conséquences d'une fécondation d'un ovocyte par un spermatozoïde dont le taux de fragmentation de l'ADN serait significatif, il est également opportun de s'interroger quant aux conséquences de cette fragmentation sur les capacités fonctionnelles des spermatozoïdes. Nous avons donc répertorié pour chaque patient participant à l'étude les paramètres du spermogramme susceptibles d'être influencés par la fragmentation du

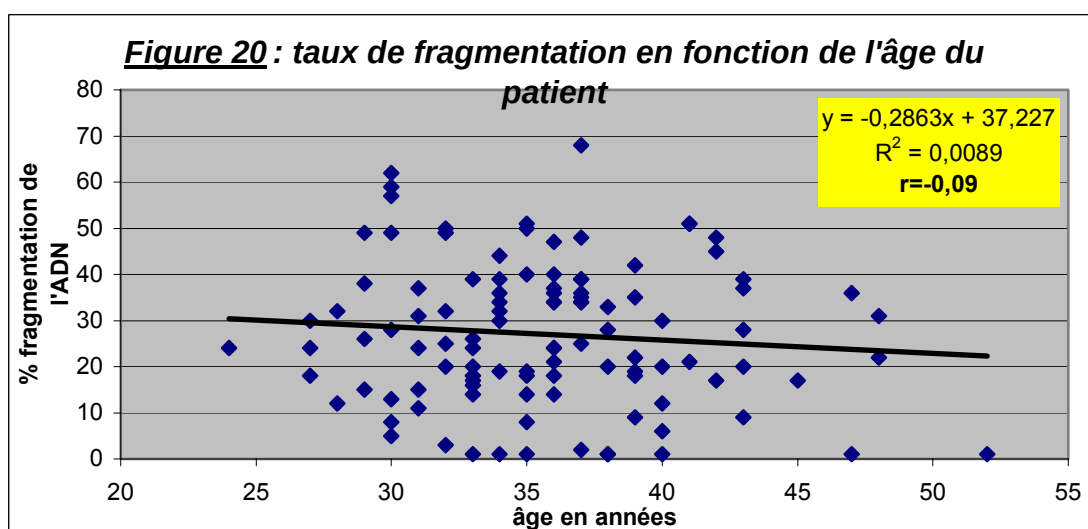
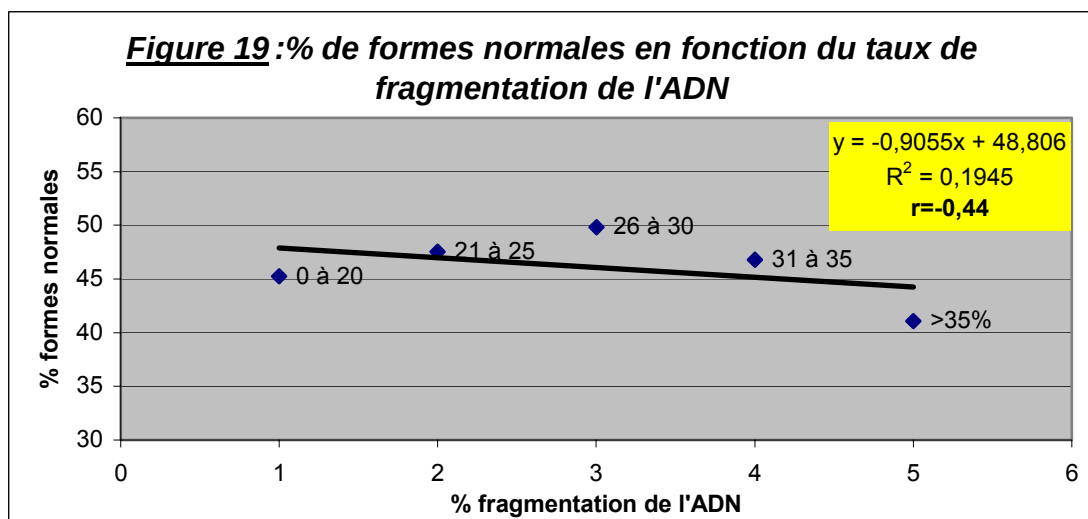
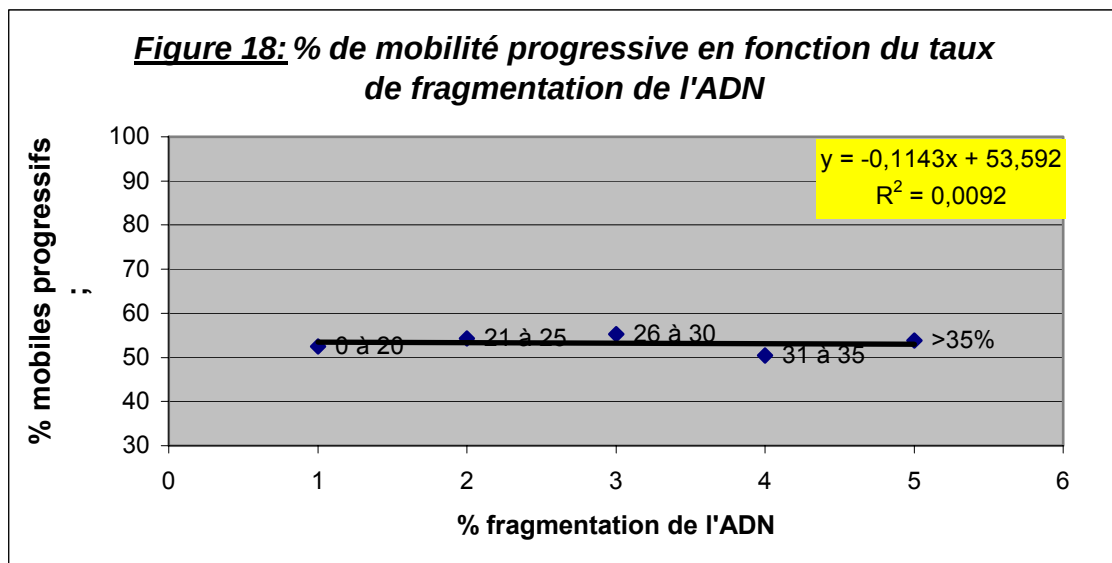
génomique, à savoir la numération des spermatozoïdes, leur mobilité progressive et leur morphologie. Nous avons également renseigné l'âge du patient (**Tableau XVI**).

Tableau XVI : Taux de fragmentation et paramètres du spermogramme

% fragmentation par catégorie	effectif associé pour chaque catégorie	numération moyenne spz en millions/ml	% moyen mobiles	% moyenne formes normales	âge moyen par catégorie
0 à 20%	43	73,6	53	45	36,0
21 à 25%	12	65,4	54	48	35,0
26 à 30%	8	91,4	55	50	35,6
31 à 35%	13	52,0	50	47	35,7
>35%	34	58,2	54	41	35,9

A la différence des événements testés précédemment, les paramètres du spermogramme et l'âge représentent des variables quantitatives. Nous sommes donc en présence de 2 variables quantitatives : le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et les paramètres du spermogramme (numération des spermatozoïdes en millions par millilitre, mobilité et formes normales en pourcentage), ou l'âge en années. Le test statistique à employer dans cette situation est donc le test de Pearson qui détermine le coefficient de corrélation r permettant d'étudier et de mesurer la relation mathématique entre 2 variables quantitatives. Ce coefficient peut être calculé mathématiquement ou obtenu en traçant la droite de régression $y=f(x)$, la pente de cette droite correspondant au coefficient r . La force d'association est donnée par la valeur absolue de ce coefficient, elle est comprise entre 0 et 1. Plus elle tend vers 1 et plus l'association est intense. Un signe positif témoigne d'une association positive, c'est à dire que y croît avec x , tandis qu'un signe négatif témoigne d'une association négative, y décroît lorsque x croît. Les droites de corrélation correspondant aux paramètres du spermogramme et à l'âge sont représentées ci-après. Nous remarquerons que pour les paramètres du sperme nous traçons « numération, mobilité, morphologie » en fonction du taux de fragmentation de l'ADN spermatique, tandis que pour le paramètre « âge » nous traçons le taux de fragmentation en fonction de l'âge du patient.





Pour chacun des 3 paramètres du spermogramme testés, nous constatons qu'il n'existe pas de corrélation positive entre le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et ces paramètres. En effet, les coefficients de corrélation obtenus sont de faible intensité. Ainsi, quel que soit le taux de fragmentation, les paramètres spermatiques masculins ne varient

pas. On peut donc conclure que, dans ce travail, le taux de fragmentation de l'ADN spermatique ne semble pas entraîner de modifications des capacités fonctionnelles des spermatozoïdes. Quant à l'âge du patient, il ne s'agit plus, comme pour tous les événements testés précédemment d'évaluer les conséquences de la fragmentation de l'ADN spermatique, mais de savoir si cette fragmentation peut s'expliquer par certains facteurs physiologiques, notamment l'âge. En effet, est-ce que l'âge plus avancé des hommes suivis pour des troubles de la fertilité pourrait être à l'origine d'un taux de fragmentation plus prononcé. D'après la droite de régression obtenue, nous ne pouvons pas conclure à l'existence d'une corrélation entre l'âge du patient et le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes de ce patient.

Afin de réaliser une synthèse des résultats obtenus au moyen des tests statistiques présentés dans cette première partie d'analyse des résultats, le tableau synthétique suivant, reprenant les événements testés et la valeur du **p** attribuée par le test du *Chi deux*, est proposé (**Tableau XVII**).

Tableau XVII : Synthèse, taux de fragmentation

	0-20%, 21-25%, 26-30%, 31-35% et >35%	0 à 20% vs >20%	0 à 25% vs >25%	0 à 30% vs >30%	0 à 35% vs >35%
<= 50% ovocytes fécondés	p=0.45	p=0.19	P=0.55	p=0.48	p=0.44
Mauvaise qualité embryonnaire	p=0.78	p=0.15	P=0.05	p=0.03	p=0.07
Pas de grossesse	p=0.42	p=0.20	P=0.83	p=0.26	p=0.38
Arrêt de la grossesse	p=0.60	p=0.89	P=0.78	p=0.36	p=0.37
Numération des spermatozoïdes en millions/mL	R=-0,45				
% mobilité	r≈0				
% formes normales	R=-0.44				
Age en années	R=-0.09				

Comme l'indique le tableau ci-dessus, le seul critère qui semblerait affecté par le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est la mauvaise qualité embryonnaire (p entre 0,03 et 0,07 lorsque le taux de fragmentation est >25%, sans qu'une valeur seuil ne soit encore définie).

Partie 3 : Etude de relation entre l'indice de fragmentation et divers événements

Jusqu'ici, l'interprétation des résultats s'est faite à partir du taux de fragmentation total, la distinction des différentes nuances de coloration brune des spermatozoïdes n'intervenant pas. La troisième partie de l'analyse de ces résultats va consister à savoir si l'intensité de coloration des spermatozoïdes et donc l'importance des lésions génomiques serait un indicateur plus valable que le taux global de fragmentation. Pour ce faire, nous avons défini un index de fragmentation attribué en fonction de l'intensité de coloration brune. Ainsi, aux spermatozoïdes de coloration brun clair est attribué le facteur 1, aux spermatozoïdes brun moyen le facteur 2 et aux spermatozoïdes brun foncé le facteur 3. Le taux de fragmentation est alors transcrit en indice de fragmentation. Cependant la catégorisation en 3 nuances de brun n'étant pas réalisée d'emblée, et cette lecture ne pouvant pas être réalisée *a posteriori* (les lames s'oxydent rapidement), l'effectif pour lequel l'indice de fragmentation est calculé sera de 66. Le tableau des résultats devient alors le suivant (**Tableau XVIII**).

Tableau XVIII: Résultats de l'étude TUNEL rapportés à l'indice de fragmentation

	Age	% Fragmentation	Indice Fragmentation	Ovocytes fécondés/inséminés	Nb embryons obtenus	Nb embryons transférés	Qualité embryonnaire à J2	Nb blastocystes obtenus	Issue de grossesse	Rmq
45	37	35	38	11/14	11	3	reg	0	1	
46	34	38	44	11/15	11	2	reg	0	1	
47	32	20	31	6/7	6	2	reg	0	0	
48	29	62	106	2/10	2	2	irreg	0	0	
49	33	33	53	2/11	2	2	irreg	0	0	
50	36	22	33	10/12	10	2	reg	0	0	
51	33	18	23	5/11	5	2	reg/irreg	0	1	
52	33	37	47	7/11	7	2	reg	0	1	
53	33	35	49	12/16	12	2	reg	0	0	
54	34	39	63	14/16	14	2	reg	0	1	
55	35	51	97	10/12	10	1	reg	1	0	
56	32	14	22	10/10	10	2	reg	0	0	
57	38	6	9	1/8	1	1	reg	0	0	
58	34	13	20	11/12	11	2	reg	0	0	
59	37	30	40	2/2	2	2	reg	0	0	
60	31	24	32	10/11	10	2	reg	1	0	
61	34	18	41	9/9	9	2	reg	0	1	
62	33	36	49	6/13	5	2	reg	0	0	
63	31	<1	1	0/1	0	0	0	0	0	
64	33	5	5	4/14	3	2	reg	1	0	
65	31	3	3	11/16	11	2	reg/irreg	1	0	
66	37	<1	1	12/13	11	2	reg	0	0	
67	32	<1	1	9/14	8	3	irreg	0	0	
68	30	40	59	10/11	9	2	irreg	0	0	
69	33	49	91	3/5	3	2	reg/irreg	0	1	
70	27	49	109	9/18	9	2	reg	0	0	
71	33	39	50	3/5	3	2	irreg	0	0	
72	30	<1	1	6/8	6	2	reg	0	0	
73	36	47	109	6/9	6	2	reg	0	0	BH+
74	30	24	39	5/23	5	2	reg	0	0	
75	37	34	58	8/9	8	2	reg	0	0	BH+
76	35	38	54	4/4	4	2	0	0	0	
77	30	25	44	15/16	15	2	0	0	0	
78	38	12	19	0/3	0	0	reg	2	0	BH+

79	34	20	31	11/23	11	0	reg	0	0	BH+
80	40	18	28	11/14	11	2	reg	0	0	
81	40	30	55	3/10	3	3	reg/irreg	0	0	
82	30	20	36	6/8	5	2	reg	0	1	
83	29	13	19	13/15	13	2	reg	0	0	
84	31	26	35	2/4	2	2	reg	0	0	
85	37	21	33	16/21	15	2	irreg	0	1	
86	35	14	23	10/20	10	2	reg	0	0	
87	36	28	52	11/15	11	2	reg	4	0	
88	28	34	68	12/17	12	2	reg	0	0	BH+
89	27	15	28	8/10	8	1	reg	0	1	
90	31	32	44	9/15	9	2	reg	0	0	
91	28	59	93	12/17	12	2	reg	0	1	
92	38	22	40	9/14	3	2	reg	1	0	
93	34	25	48	7/21	7	2	irreg	1	0	BH+
94	28	28	46	3/5	3	2	reg	1	0	
95	33	24	57	1/3	1	1	reg	0	0	
96	34	18	25	0/9	0	0	0	0	0	
97	35	31	48	4/5	2	2	reg/irreg	0	1	
98	33	17	23	0/4	0	0	0	0	0	
99	38	20	30	4/12	4	3	irreg	0	0	
100	32	19	53	8/10	8	2	reg	0	1	
101	33	<1	1	3/10	3	3	irreg	0	1	
102	37	<1	1	7/12	7	2	reg	0	0	BH+
103	31	50	77	9/13	9	1	reg/irreg	1	0	
104	28	26	33	16/17	16	2	reg	0	0	
105	31	17	21	8/11	8	2	irreg	0	1	
106	44	17	23	10/20	10	2	reg	0	0	
107	27	14	17	4/8	4	2	irreg	0	1	
108	34	15	30	10/12	10	2	reg	0	0	
109	25	24	36	6/7	6	2	reg	0	1	
110	36	36	72	3/4	3	2	reg	0	0	

Nous procédons aux mêmes tests statistiques que précédemment. Pour ce faire, nous trions les données en fonction de l'indice de fragmentation qui s'échelonne entre 1 et 110. Cette fois-ci nous travaillons à partir d'un effectif de 66 patients, et nous pouvons constater que la majorité de ces patients possède un indice de fragmentation entre 20 et 60 (42/66, soit 64%). Nous avons donc réalisé des intervalles d'indice de fragmentation de 10 unités entre ces valeurs 20 et 60. Nous définissons ainsi 6 tranches différentes : 1 à 20, 21 à 30, 31 à 40, 41 à 50, 51 à 60 et >60. Nous représentons les résultats des tests du *Chi deux* et des tests de corrélation sous forme de tableau synthétique (**Tableau XIX**).

Tableau XIX : Synthèse, indice de fragmentation

	0-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, >60	0 à 20 vs >20	0 à 30 vs >30	0 à 40 vs >40	0 à 50 vs >50	0 à 60 vs >60
≤50% ovocytes fécondés	p=0.43	p=0.47	P=0.07	p=0.29	p=0.35	p=0.52
Mauvaise qualité embryonnaire	p=0.09	p=0.63	P=0.16	p=0.86	p=0.64	p=0.66

Pas de grossesse	p=0.87	p=0.61	P=0.81	p=0.82	p=0.96	p=0.97
Arrêt de la grossesse	p=0.75	p=0.92	p=0.94	p=0.96	p=0.61	p=0.64
Numération des spermatozoïdes en millions :mL	r≈0					
% mobilité	r=+0.49					
% formes normales	r=-0.45					
Age en années	r=-0.21					

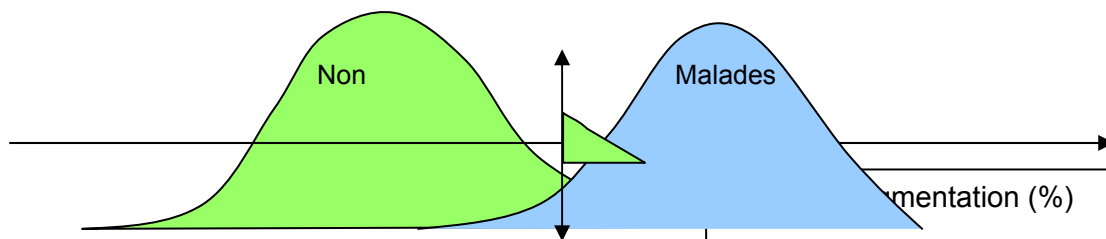
Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus ne sont pas concluants, au mieux nous obtenons un **p=0.07** lorsque nous testons l'indice de fragmentation <30 *versus* l'indice de fragmentation>30 et le taux de fécondation des ovocytes inséminés. Concernant la mauvaise qualité embryonnaire, par analogie au test « taux de fragmentation », nous pensions retrouver au moins les mêmes résultats significatifs pour ce paramètre, ce qui n'est pas le cas. Nous obtenons, pour le test de comparaison « indice de fragmentation et qualité embryonnaire », une différence qui serait significative si le risque de 10% est adopté (**p=0.09**).

Par ailleurs, les coefficients de corrélation obtenus à propos des paramètres du sperme et de l'âge du patient en fonction de l'indice de fragmentation sont de faible intensité voire nuls, il n'y a donc aucune relation entre ces paramètres et l'indice de fragmentation.

Partie 4 : Détermination d'une valeur seuil critique

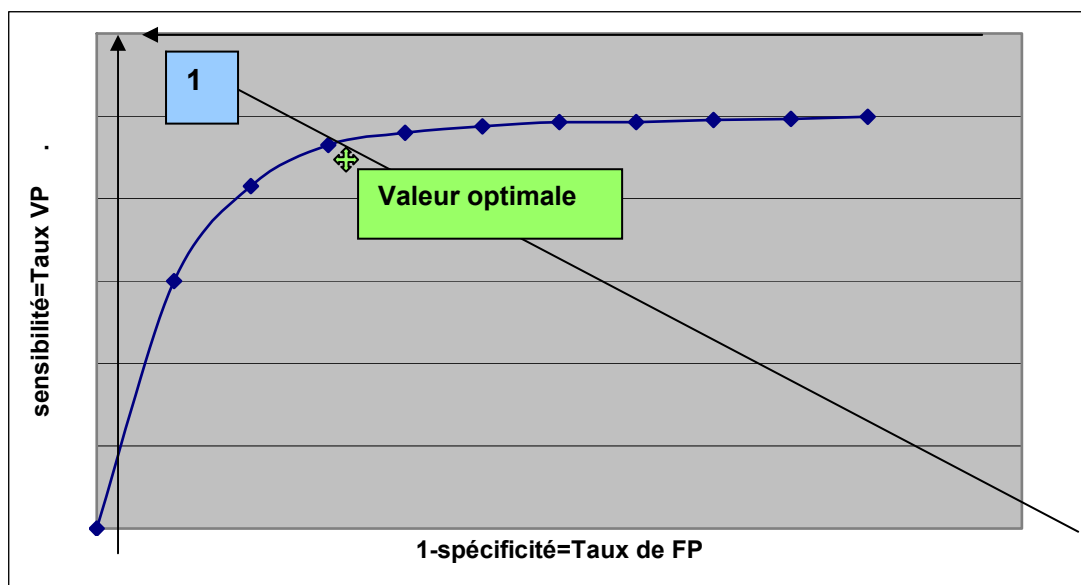
D'après les résultats obtenus pour les tests statistiques de relation entre le taux de fragmentation des spermatozoïdes et divers événements consécutifs à la fécondation d'ovocytes par ces spermatozoïdes d'une part, et les paramètres du spermogramme d'autre part, il ressort que la mauvaise qualité embryonnaire à J2 serait le seul paramètre corrélé négativement au taux de fragmentation de l'ADN. L'objet de cette quatrième et dernière partie analytique des résultats va consister à savoir s'il existe un seuil à partir duquel ce taux de fragmentation est prédictif d'une mauvaise qualité embryonnaire. Dorénavant, nous nous intéresserons à cet unique paramètre, dans la mesure où l'étude statistique a montré qu'il n'existe pas de corrélation entre le taux de fragmentation et les autres variables. Pour déterminer la valeur seuil optimale (cut-off) du taux de fragmentation de l'ADN spermatique, nous allons tracer les courbes de ROC (Receiving Operating Characteristic Curvers)

correspondant à cet évènement. Lorsque dans une population de « malades » et de « non malades », l'examen dont on cherche à évaluer la valeur diagnostique est une variable quantitative, en l'occurrence le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, la distribution de cette variable peut être modélisée par 2 courbes, l'une représentant les valeurs observées chez les malades et l'autre celles observées chez les non malades. Il est habituel que ces 2 courbes se recoupent comme suit.



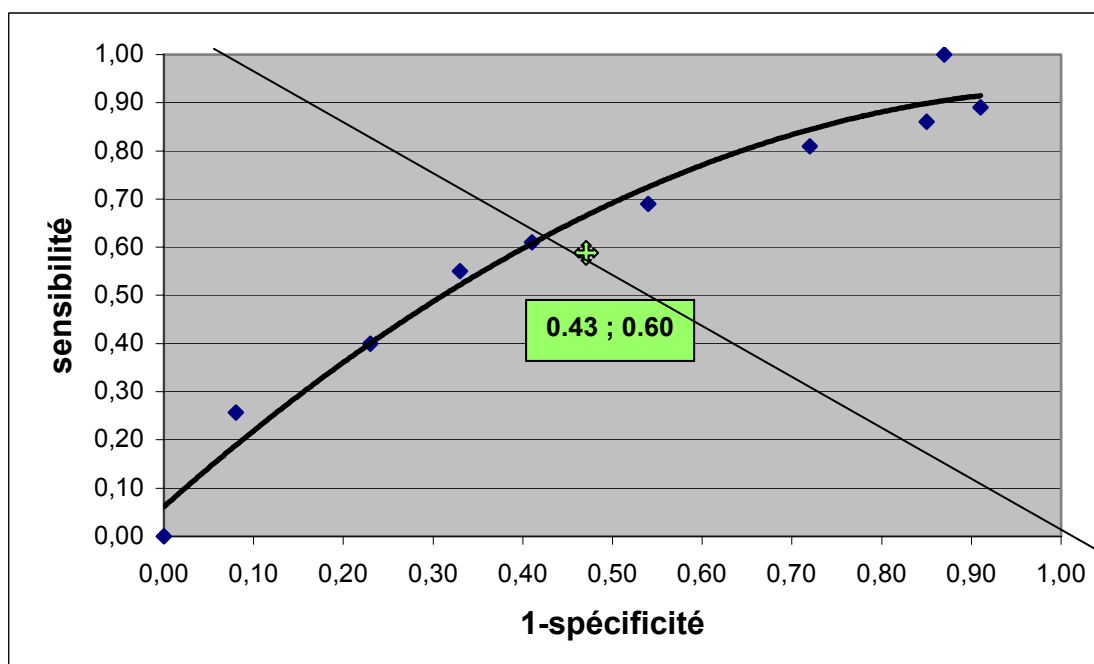
En fonction de la valeur limite choisie, le phénomène habituel de variation en sens opposé de la sensibilité et de la spécificité de l'examen est observé. A chaque valeur de taux de fragmentation correspondent une sensibilité et une spécificité, et lorsque la sensibilité est proche de 100%, la spécificité correspondante est proche de 0%, alors que lorsque la sensibilité est voisine de 0%, la spécificité approche les 100%. Il existe une valeur optimale pour laquelle sensibilité et spécificité seront maximales. C'est l'objectif des courbes de ROC. Dans les courbes de ROC, l'axe des abscisses correspond à « 1- la spécificité » ou taux de faux positifs (FP) et l'axe des ordonnées à « la sensibilité » ou taux de vrais positifs (VP). La valeur optimale est alors celle qui correspond au point pour lequel la somme des erreurs est la plus faible et donc l'information maximale. Il s'agit du point d'inflexion entre la courbe de ROC et la deuxième bissectrice de l'axe des abscisses et celui des ordonnées, comme le montre l'exemple de courbe suivant (**figure 21**).

Figure 20 : Courbe de ROC



Pour tracer la courbe de ROC correspondant à l'événement « mauvaise qualité embryonnaire », nous calculons, pour cet événement et pour chaque intervalle de taux de fragmentation de l'ADN spermatique, la sensibilité et la spécificité associées à ce test « taux de fragmentation » (figure 22).

Figure 22 : Courbe de ROC pour l'événement « qualité embryonnaire à J2 »



La courbe de ROC que l'on obtient lorsque l'on trace « sensibilité » en fonction de « 1-spécificité » pour l'événement « embryon irrégulier » donne un cut-off pour ce test correspondant à une sensibilité de 60% et une spécificité de 57% (1-spécificité = 0,43). D'après les coordonnées de ce point, on peut en déduire que la valeur seuil (cut-off) pour l'événement « embryon irrégulier » est un taux de fragmentation de l'ADN proche de 25% (25-26%), c'est à dire qu'au delà de cette valeur, le risque d'obtenir un embryon irrégulier est maximal. Toutefois, comme il l'a été expliqué au cours de la définition d'une valeur seuil, l'idéal est lorsque la courbe de ROC se rapproche du point 1, ce qui n'est pas le cas présent.

5 DISCUSSION

Suite à l'individualisation du groupe à risque « fumeurs », nous envisagions d'évaluer les possibles lésions génomiques liées au tabac testant la relation entre le facteur « tabac » et le facteur « taux de fragmentation ». Dans ce cadre, il nous fallait croiser les données masculines et féminines. Or, nous avons été confrontés à un problème de méthodologie directement lié au respect de la personne et aux contraintes éthiques. En effet, l'identification de nos questionnaires devait impérativement respecter l'anonymat des patients sans quoi il nous aurait fallu l'accord du CCPPRB (Comité Consultatif pour la Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale). La complexité du recueil des données nous a donc freinés dans l'exploitation de nos données.

Outre ces problèmes de méthodologie, les limites de notre étude ont été les suivantes : des effectifs trop restreints pour l'analyse d'événements particuliers malgré un effectif global satisfaisant, une technique d'interprétation délicate et subjective, mais ce biais a été contourné en choisissant un seul lecteur et enfin une population de spermatozoïdes étudiés hétérogène car nous ne disposons pas de moyens nous permettant d'affirmer que les spermatozoïdes étudiés par la technique TUNEL et dits « fragmentés » sont les spermatozoïdes concernés par la technique de fécondation *in vitro*. Le second temps de cette analyse était de faire le point sur l'intérêt, en terme diagnostique et biologique, de la détermination du taux de fragmentation de l'ADN spermatique. En effet, devant les nombreux travaux publiés à ce sujet nous avons tenté d'évaluer à notre échelle l'intérêt d'un tel paramètre. A l'image de la majorité de ces publications, la technique que nous avons retenue pour la détermination du taux de fragmentation était la technique TUNEL. L'analyse intermédiaire des résultats était plutôt axée sur la comparaison des résultats de fécondation *in vitro* pour 2 populations de « patients » ; les patients ayant recours à la FIV conventionnelle et ceux ayant recours à la FIV-ICSI. Face au trop faible effectif (n=44), et peut être aussi en raison de l'absence de significativité du paramètre « issue de grossesse » testé, aucune conclusion ne ressort de cette analyse statistique

primaire. Confrontées aux exigences liées à la réalisation de la technique, les conditions de recrutement des patients participant à l'étude ont du être modifiées, de sorte que l'inclusion des patients pris en charge par FIV-ICSI est devenue quasiment nulle. Nous n'avons donc pu confirmer les hypothèses émises lors de l'analyse des premiers résultats.

Ensuite, l'analyse de nos résultats a été orientée par les nombreuses publications de la littérature traitant des conséquences possibles de la fécondation par un spermatozoïde ayant un haut degré de fragmentation de son ADN. En effet, selon ces articles, la fragmentation peut avoir un impact sur toutes les étapes depuis l'insémination de l'ovocyte jusqu'au développement embryonnaire. Nous avons donc cherché à évaluer les conséquences de la fragmentation de l'ADN sur chacune de ces étapes, successivement : le taux de fécondation des ovocytes inséminés, l'évolution des embryons obtenus notamment leur aspect après 2 jours de culture *in vitro*, leur évolution au stade blastocyste, et enfin l'évolution d'une grossesse lorsqu'il y a implantation, au moyen de notre propre étude. Nous nous sommes également intéressés aux conséquences de la fragmentation sur les propriétés fonctionnelles de ces spermatozoïdes.

Concernant la relation entre le taux de fragmentation et le taux de fécondation, les articles parus à ce sujet divergent. Selon Sun (Sun et al., 1997), ce taux ne doit pas être supérieur à 4% pour obtenir une fécondation, en d'autres termes le taux de fragmentation peut facilement être incriminé dans un échec de fécondation. Pour Lopes et son équipe (Lopes et al., 1998b), un taux de fragmentation <25% est compatible avec la fécondation des ovocytes. Pour Tomlinson, Morris et Virro, (Morris et al., 2002, Tomlinson et al., 2001, Virro et al., 2004), il n'y a pas de corrélation entre les 2 paramètres. De même, nous ne retrouvons pas de corrélation entre le taux de fragmentation et le taux de fécondation (**p=0,45**).

D'après Sakkas et son équipe (Sakkas et al., 1998) ou encore pour Jurisicova (Jurisicova et al., 1996a, Jurisicova et al., 1996b), les altérations de l'ADN des spermatozoïdes ont un effet néfaste sur le développement embryonnaire à J2 puis sur le blastocyste. L'étude de Virro (Virro et al., 2004) confirme que la fragmentation de l'ADN est corrélée au mauvais développement embryonnaire puis au faible taux d'obtention de blastocyste. Pour notre part, nous constatons que la qualité embryonnaire à J2 de culture est significativement affectée lorsque l'ADN est hautement fragmenté (**p=0.03**). Pour cet événement nous avons déterminé un seuil critique (ou cut-off) à 25%. Pour évaluer la valeur diagnostique de ce taux seuil de 25%, on peut déterminer la valeur prédictive positive ou probabilité que l'événement « mauvaise qualité embryonnaire » se produise si le taux de fragmentation est supérieur au seuil de 25%. D'après nos résultats, la valeur prédictive positive associée à cet événement « mauvaise qualité embryonnaire » serait de 0,55 (ou 55%), c'est à dire que lorsque le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est supérieur à 25%, la probabilité que l'embryon soit de mauvaise qualité est de 55%. Par contre, l'étude de Guérin et Benchaïb (Guerin & Benchaib, 2004) montre qu'il n'existe pas de corrélation entre le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et la qualité de l'embryon au deuxième jour de développement, l'impact négatif paternel pouvant, selon leur interprétation, se matérialiser après le troisième jour post-insémination seulement. Dans l'étude de Tesarik (Tesarik et al., 2004), qui porte sur le rôle tardif des dommages du génome paternel, pour leur groupe « pas de grossesse et embryons transférés sans altérations morphologiques », le taux de fragmentation est très élevé. Si on regarde nos résultats, dans notre groupe « pas de grossesse et embryons réguliers », soit 56 patientes, le taux de fragmentation est >20% ([22%-51%] ; m=31,8%) pour 34 patients, soit 61%, ce qui peut être interprété comme un pourcentage élevé, mais dans le groupe « pas de grossesse et embryons irréguliers », 22 patients sur 26 (84%) ont un taux de fragmentation >20% ([21%-68%] ; 41,1%). Le taux de fragmentation de l'ADN est donc significativement plus représenté dans le groupe « pas de grossesse et embryons irréguliers » que dans celui avec des embryons réguliers (**p<0.01**). On peut donc supposer ceci, lorsque l'embryon est irrégulier et si le taux de fragmentation a été mesuré au delà de 20%, les chances de grossesse sont diminuées. Par ailleurs, si on compare les grossesses obtenues lorsque l'embryon transféré est, *a priori*, de bonne qualité, par rapport au taux de fragmentation en prenant un seuil de 20%, les chances d'obtenir une grossesse ne sont pas significativement affectées par un taux >20% (**p=0.65**). Nous ne

vérifions donc pas l'hypothèse d'un effet délétère tardif lorsque le génome paternel est hautement fragmenté.

En outre, si on ne s'intéresse qu'au taux de fragmentation et son impact sur le taux de grossesses à terme, Benchaïb et son équipe (Benchaib et al., 2003) observent qu'un taux <20% est compatible avec une grossesse, pour Henkel (Henkel et al., 2003) ce seuil est de 36% et pour Duran (Duran et al., 2002) il est de 12%. Cette grande variabilité des valeurs montre la difficulté à les interpréter. Huang (Huang et al., 2005) réfute l'existence d'une corrélation entre le taux de fragmentation et le taux de grossesses à terme. Notre étude confirme cette dernière observation. En effet, nous n'observons aucune relation entre ces 2 variables ($p=0.20$).

Par ailleurs, Carrell et son équipe (Carrell et al., 2003) rapporte un taux de fausses couches spontanées corrélé à un taux de fragmentation >36%. Notre recrutement ne nous permet pas de tester cette hypothèse. En effet nous n'avons pu recenser que 3 cas de fausses couches spontanées précoces.

Concernant l'analyse des paramètres du sperme (numération, mobilité, morphologie), notre étude de corrélation ne montre manifestement aucune corrélation entre le taux de fragmentation de l'ADN et ces paramètres ($r=0.45$, $r=0$ et $r=-0.44$ respectivement pour la numération, la mobilité et la morphologie). Les propriétés fonctionnelles des spermatozoïdes ne seraient donc pas affectées par les dommages génomiques. Nos observations sont en accord avec celles de certaines équipes, notamment celle de Guérin (Guerin et al., 2005) et celle de Giwerzman (Giwerzman et al., 2003). Pour Guérin, à l'exception notoire de la nécrospERMIE, les différents paramètres du spermogramme (numération et mobilité) ne sont pas corrélés au taux de fragmentation ($r=0.01$ et $r=0.4$ respectivement). Par contre, la nécrospERMIE >30% serait un appel fort pour une analyse de fragmentation de l'ADN spermatique car ils admettent que la fragmentation serait l'étape ultime précédant la mort du spermatozoïde. Nous n'avons pu confirmer cette observation dans la mesure où la nécrospERMIE n'est pas mesurée systématiquement au cours du bilan pré-FIV mais uniquement lorsqu'il y a une asthénospermie sévère. L'implication directe de l'absence de corrélation entre le taux de fragmentation et les paramètres du sperme, sur le plan de la prise en charge thérapeutique d'une infécondité par fécondation *in vitro*, serait que, quelle que soit la technique utilisée (FIV conventionnelle ou ICSI) il n'est pas possible de différencier un spermatozoïde à ADN significativement fragmenté d'un autre. Il pourra donc être le spermatozoïde sélectionné pour la micro-injection ou le spermatozoïde fécondant au cours de la FIV conventionnelle. C'est ainsi que nous pourrions expliquer les résultats de la première analyse selon lesquels il n'y aurait pas plus de risque d'avoir des situations d'échec de grossesse en FIV conventionnelle qu'en ICSI. Cependant, Sun ou Huang (Huang et al., 2005, Sun et al., 1997, Huang, 2005 #224) réfutent cette observation car d'après leurs études il existe une corrélation négative entre le taux de fragmentation et la mobilité et les caractéristiques du mouvement.

Par ailleurs, au cours de notre étude, la notion d'accumulation de lésions génomiques est venue compléter notre analyse. Nous avons émis l'hypothèse que si l'intensité de la coloration brune de la tête des spermatozoïdes était le reflet de la somme des dommages de l'ADN, les conséquences biologiques en seraient d'autant plus flagrantes. C'est ainsi que nous avons défini un indice de fragmentation qui pondérerait l'intensité de coloration. En faisant une revue de littérature, jamais nous n'avons retrouvé d'article faisant état d'un tel indice. Il s'agit donc d'un indicateur non validé biologiquement que nous testons au cours de notre travail. Pour ce faire nous avons reproduit la même démarche analytique que pour l'analyse du taux de fragmentation, mais nous n'avons pu apporter de conclusions significatives concernant ce test « indice de fragmentation ». Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats : le petit effectif à partir duquel nous avons travaillé (65 *versus* 110 pour le taux de fragmentation), et/ou l'absence de significativité de cet indice. Finalement, d'après l'analyse statistique de nos résultats, on retiendra qu'un taux de fragmentation >25% affecte significativement la qualité embryonnaire à J2 en terme de morphologie, et que lorsque l'embryon est irrégulier et le taux de fragmentation est élevé les chances de grossesse sont diminuées.

La détermination du taux de fragmentation de l'ADN spermatique peut, *a posteriori*, offrir des éléments de discussion en cas d'échecs de fécondation *in vitro*, notamment dans les situations d'infertilité inexpiquée. Ainsi, un taux supérieur à 25% peut expliquer des situations d'échecs de fécondation *in vitro*, et du même coup pourrait permettre une lecture différente du dossier du couple, modifier sa prise en charge. Mais en aucun cas, si on envisageait de déterminer d'emblée le taux de fragmentation au cours du bilan systématique de pré-FIV, nous pourrions prédire de l'issue de la grossesse, et ce en raison de l'hétérogénéité de la population des spermatozoïdes.

En cas d'échecs répétés de fécondation *in vitro*, si le taux de fragmentation des spermatozoïdes est >20%, nous pourrions envisager de proposer au patient d'essayer d'agir par des moyens thérapeutiques sur cette fragmentation. Quelques études se sont appliquées à étudier les bénéfices d'une supplémentation vitaminique et anti-oxydante chez des patients avec un taux de fragmentation élevé. Ainsi, dans son étude, Greco (Greco et *al.*, 2005b) démontre q'une supplémentation en vitamines C et E, à raison de 1 gramme par jour pendant 2 mois, réduit significativement le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, de plus ils constatent une augmentation du taux d'implantation et de grossesses cliniques.

CONCLUSION

L'enquête menée au sein du laboratoire de Médecine du Développement et de la Reproduction du CHU de Nantes nous a permis de caractériser comme groupe à risque la population des fumeurs actifs présentant des troubles de la fertilité. Nous ne pouvons pas affirmer, au moyen de cette enquête, que le tabac est le facteur causal de ces troubles néanmoins, si des troubles préexistent ils peuvent être aggravés par la consommation régulière du tabac. Cette population masculine constitue donc une cible majeure en matière de prévention anti-tabagique. Pour ces patients, outre les discours de prévention qui bien souvent ne suffisent pas, il faudrait pouvoir mettre en évidence concrètement les effets délétères du tabac par un test biologique. Nous avons choisi le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes comme indicateur potentiel des effets liés au tabac. En raison des problèmes de méthodologie expliqués précédemment, nous n'avons pu répondre à cet objectif ambitieux. Par ailleurs, face aux avis divergents de la littérature, nous alimentons le débat quant à la place que nous devons accorder à ce paramètre. Malgré la mise en évidence d'une corrélation négative entre la qualité embryonnaire et l'intensité de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, cette évaluation de l'altération nucléaire des gamètes n'est pas, à la lumière de nos résultats, un marqueur satisfaisant de la qualité du spermatozoïde et du *conceptus*. Si ce paramètre peut représenter *a posteriori* un élément de discussion pour expliquer des situations d'échecs répétés de FIV, il n'en demeure pas moins, compte tenu du coût de la technique, de la subjectivité de lecture des lames et de la difficulté d'interprétation, que nous ne recommandons pas cet examen au cours du bilan d'exploration d'infertilité.

ANNEXES

Annexe 1, Pré-FIV

Date

N°

Le laboratoire de Biologie de la Reproduction réalise actuellement une enquête pour évaluer la possible influence de l'environnement sur la qualité du sperme. Nous vous remercions d'y participer en répondant aux questions suivantes.

- Année de naissance :
- Code postal :
- Taille/Poids :

1•Quel est votre secteur d'activité professionnelle ?

Choisissez parmi les catégories socio-professionnelles suivantes :

- ☐ Profession agricole
- ☐ Commerçant-Artisan
- ☐ Chef d'entreprise
- ☐ Ouvrier
- ☐ Enseignant, Fonctionnaire
- ☐ Cadre, Ingénieur
- ☐ Profession libérale, médicale...
- ☐ Etudiant
- ☐ Retraité
- ☐ Sans emploi
- ☐ Autres, à préciser

2•Quel est votre rythme de travail ?

☐ jour

☐ nuit

3•Quel est votre volume horaire hebdomadaire ?

☐ 35h

☐ 35-40h

☐ >40h

4•Etes-vous en contact régulièrement, ou avez-vous été en contact, avec des produits toxiques (solvants, vernis, pesticides, fongicides...) :

☐ Oui ☐ Non

si oui, précisez quel type de produit et la durée de l'exposition :

5•Votre activité professionnelle vous expose-t-elle ou vous a-t-elle exposé à la chaleur ?

☐ Oui ☐ Non

si oui, précisez dans quelles circonstances et la durée cette exposition :

6•Prenez-vous actuellement des médicaments ?

☐ Oui ☐ Non

Si oui, le(s)quel(s) :

7•Etes-vous fumeur ou avez vous été fumeur ?

☐ Oui ☐ Non

Si vous êtes fumeur, combien de cigarettes par jour fumez-vous, et depuis combien d'années ?

Si vous êtes ancien fumeur, quelle est la date de l'arrêt et quelle a été la durée du tabagisme ?

8•Mangez-vous régulièrement des fruits et légumes frais ?

☐ Oui ☐ Non

A quelle fréquence : combien par jour

combien par semaine ?

Avez-vous des remarques concernant ce questionnaire ?

Pr Paul Barrière

Annexe 2 : Résultats de l'enquête du « groupe pré-FIV »
n=159

Année de naissance		Avant 1975			Après 1975						
		120			39						
Lieu de résidence		Ville de moins de 30 000 habitants			Ville de plus de 30 000 habitants						
		93			66						
Secteur d'activité professionnelle		effectif	%			% INSEE (population active)					
	Profession agricole	5	3%			3,4%					
	Commerçant-Artisan	9	6%			3,9%					
	Chef d'entreprise	8	5%			1,1%					
	Ouvrier, Employé	57	36%			49,4%					
	Enseignant, Fonctionnaire	25	16%			25,8%					
	Cadres, Ingénieurs	37	23%			12,2%					
	Profession libérale, médicale	5	3%			1,6%					
	Etudiant	2	1%								
	Retraité	1	0,5%								
	Sans emploi	4	2,5%			9%					
Autres	6	4%									
Rythme de travail		Jour		Nuit		SE, Retraité					
		135		19		5					
Volume horaire hebdomadaire		<35h		35-40h		>40h		SE, Retraité			
		7		92		55		5			
Exposition à des produits toxiques		NON		OUI 33							
		126		Solvants, vernis		Pesticides, fongicides		Détergents	Autres, NP		
				19		6		4	4		
Exposition à la chaleur		NON		OUI 37							
		122		Soudeurs		Chantiers		Fours	Autres, NP		
				1		17		11	8		
Traitement en cours		NON		OUI 23							
		136		Antiinflammatoires		Antihypertenseurs		Antidépresseurs	Autres		
				3		8		8	4		
Tabagisme		NON		OUI 80							
				ACTIF 58			ANCIEN 22+3				
		76+3=79		Nb par jour	<10	10-20	>20	Durée en années	<10	>10	
					9	39	10		7	16	
				Durée en années	<5	5-15	>15	Date arrêt en années	<3	>3	
			1	34	23		20	3			
Consommation régulière de fruits et légumes frais		NON		OUI 92							
		67		Par jour			Par semaine				
				1-3		>3		3-7			
				84		8		92			
Association de plusieurs « Facteurs de risque » (FR)		Aucun		1 FR 80			2 FR 20			3 FR 10	
		49		Toxiques	Tabac	Chaleur	Tox+Chaleur	Tox+Tabac	Chaleur+Tabac	Toxique+Chaleur+Tabac	
				11	58	11	8	4	8	10	

Annexe 2: Résultats de l'enquête du « groupe FIV »
n=230

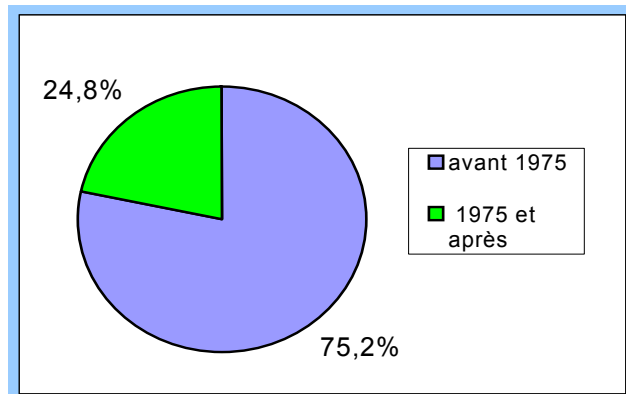
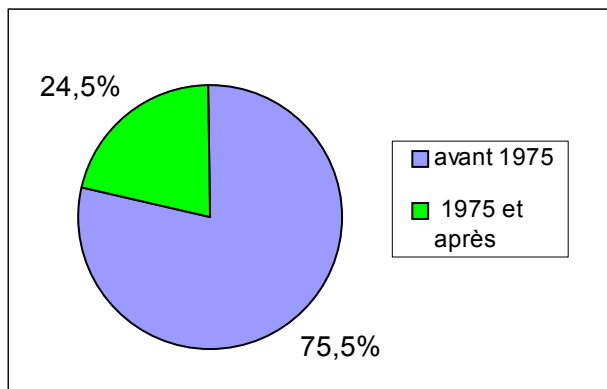
Année de naissance		Avant 1975			Après 1975												
		173			57												
Lieu de résidence		Ville de moins de 30 000 habitants			Ville de plus de 30 000 habitants												
		155			75												
Secteur d'activité professionnelle		effectif	%			% INSEE (population active)											
	Profession agricole	4	2%			3,4%											
	Commerçant-Artisan	13	6%			3,9%											
	Chef d'entreprise	6	3%			1,1%											
	Ouvrier, Employé	111	48%			49,4%											
	Enseignant, Fonctionnaire	26	11%			25,8%											
	Cadres, Ingénieurs	53	23%			12,2%											
	Profession libérale, médicale	8	4%			1,6%											
	Etudiant	2	1%														
	Retraité	1	0,5%														
	Sans emploi	2	1%			9%											
Autres	3	1,5%															
Rythme de travail		Jour		Nuit			SE, Retraité										
		199		28			3										
Volume horaire hebdomadaire		<35h		35-40h		>40h		SE, Retraité									
		2		164		61		3									
Exposition à des produits toxiques		NON		OUI 51													
		179		Solvants, vernis		Pesticides, fongicides		Détergents		Autres, NP							
				33		10		6		2							
Exposition à la chaleur		NON		OUI 44													
		186		Soudeurs		Chantiers		Fours		Autres, NP							
				5		19		16		4							
Traitement en cours		NON		OUI 25													
		205		Antiinflammatoires		Antihypertenseurs		Antidépresseurs		Autres							
				5		9		9		2							
Tabagisme		NON		OUI 115													
		101+14=115		ACTIF 101				ANCIEN 14+14									
				Nb par jour		<10		10-20		>20		Durée en années		<10		>10	
						28		62		11				8		20	
				Durée en années		<5		5-15		>15		Date arrêt en années		<3		>3	
						9		58		34				14		14	
Consommation régulière de fruits et légumes frais		NON		OUI 114													
		116		Par jour				Par semaine									
				1-3		>3		3-7									
				103		11		114									
Association de plusieurs « Facteurs de risque » (FR)		Aucun		1 FR 112			2 FR 33			3 FR 10							
		75		Toxiques		Tabac	Chaleur	Tox+Chaleur		Tox+Tabac	Chaleur+Tabac		Toxique+Chaleur+Tabac				
				18		81	13	9		12	12		10				

RÉSULTATS DE L'ENQUÊTE DÉBUTÉE LE 26/05/05

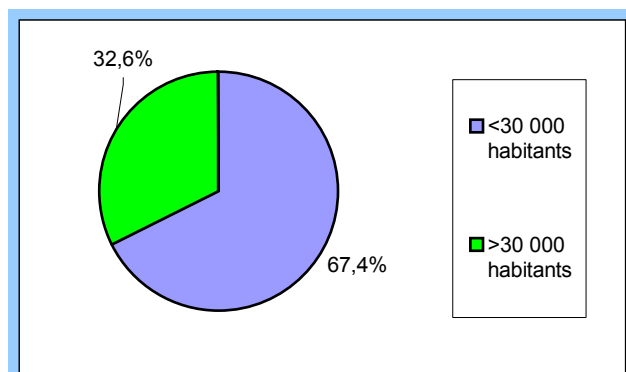
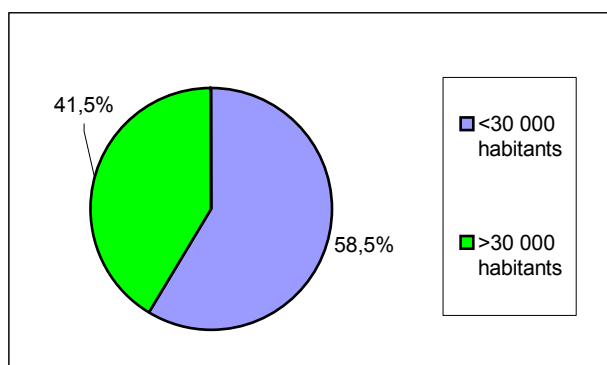
PRE-FIV

FIV et FIV/ICSI

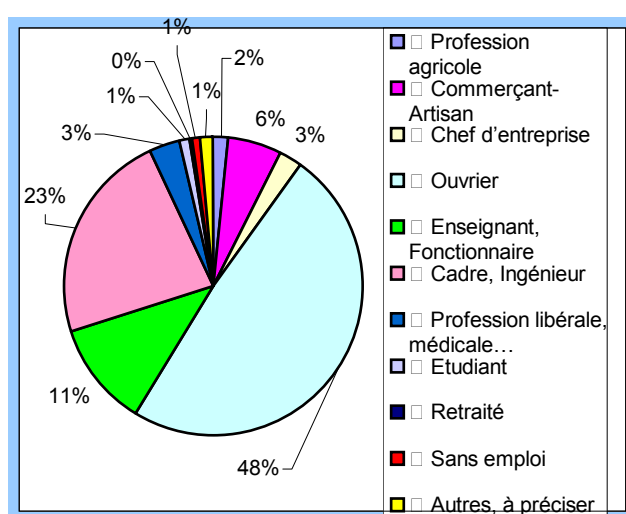
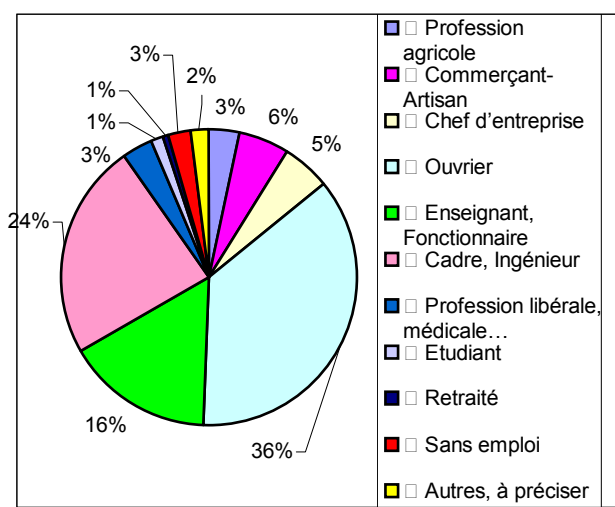
- Année de naissance



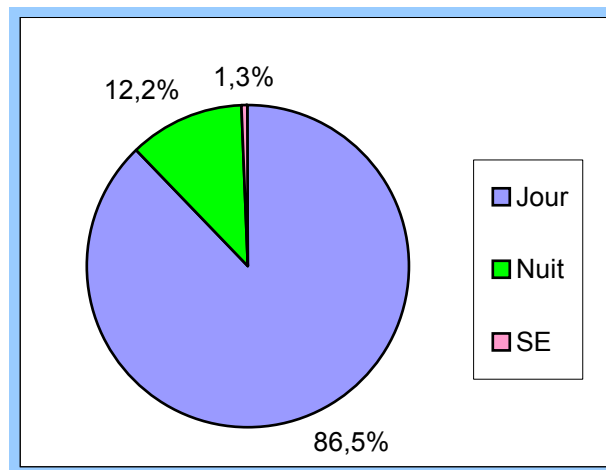
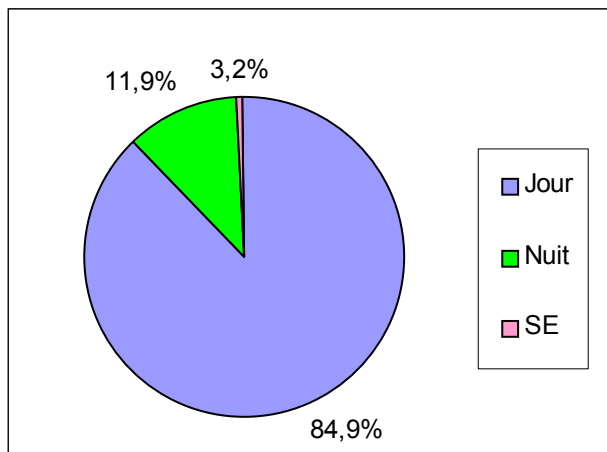
-Lieu de résidence



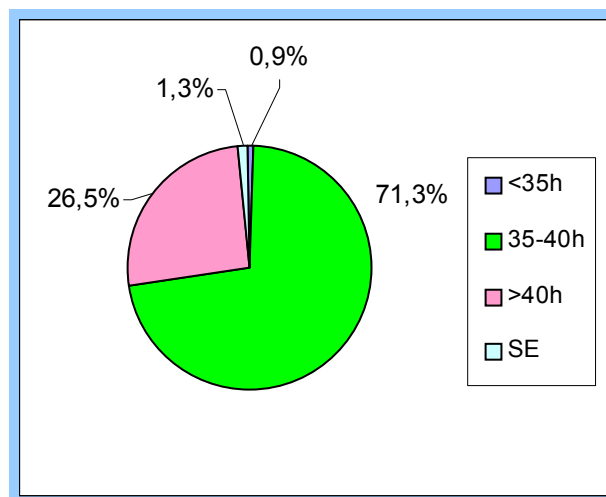
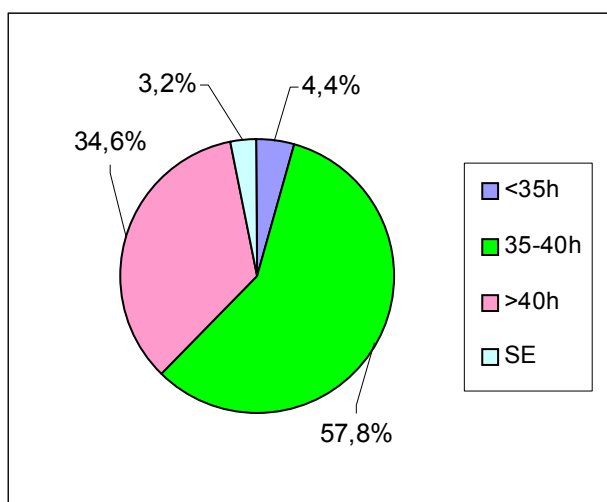
-Secteur d'activité professionnelle



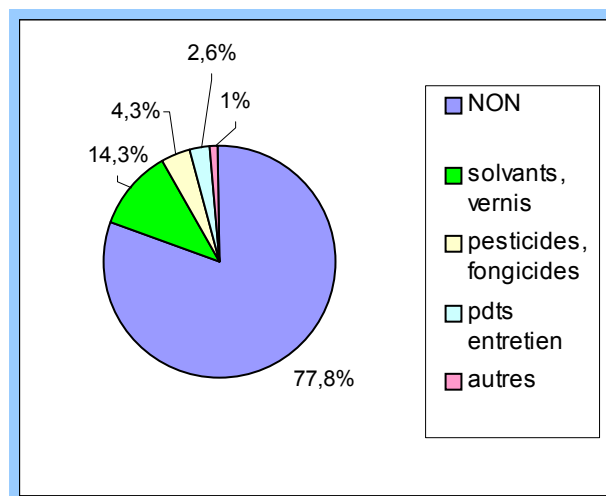
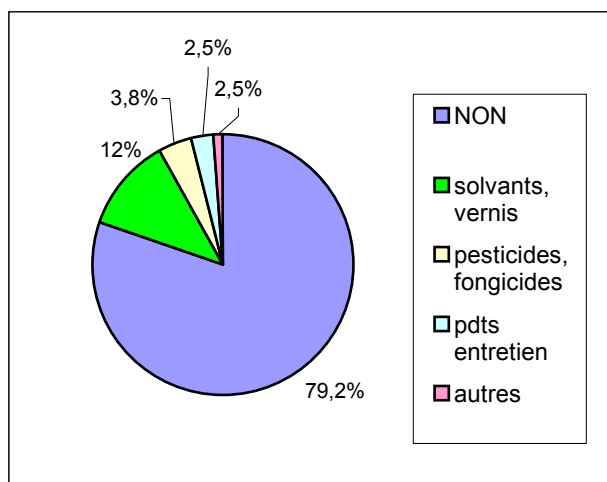
- Rythme de travail



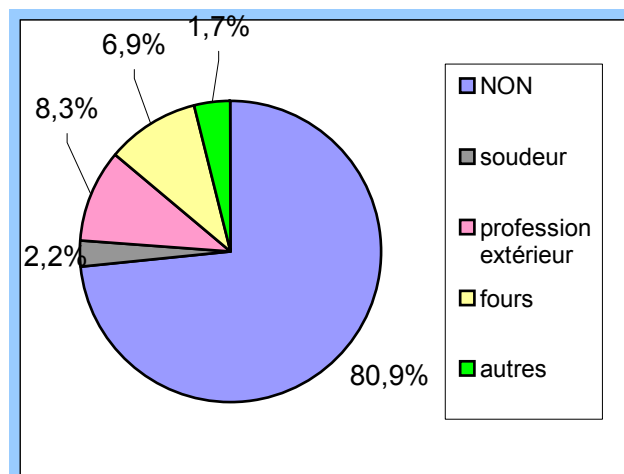
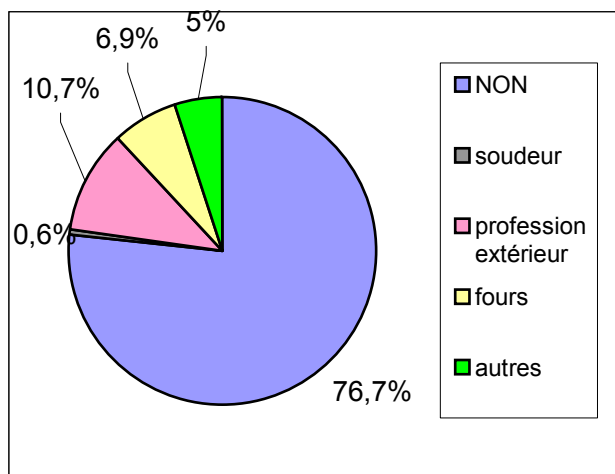
- Volume horaire hebdomadaire



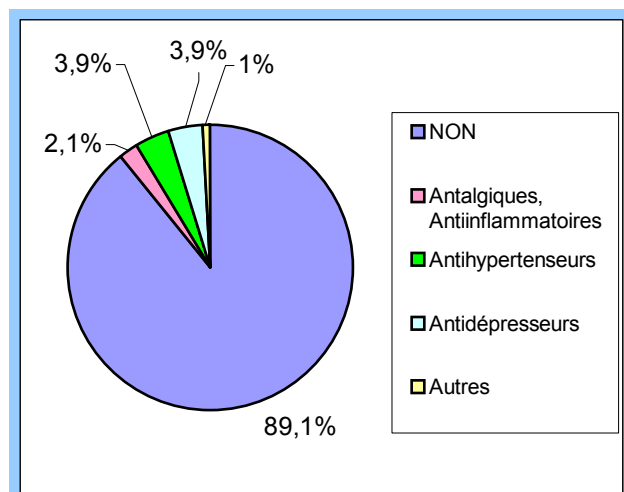
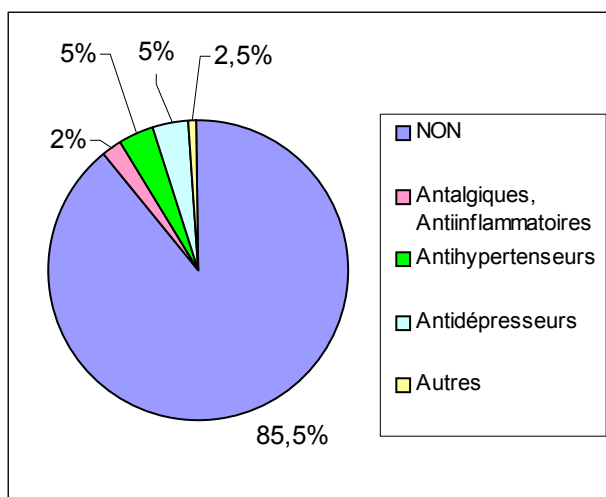
- Exposition à des produits toxiques



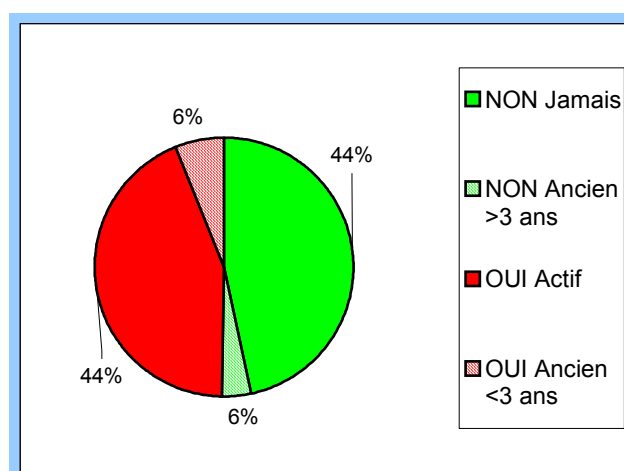
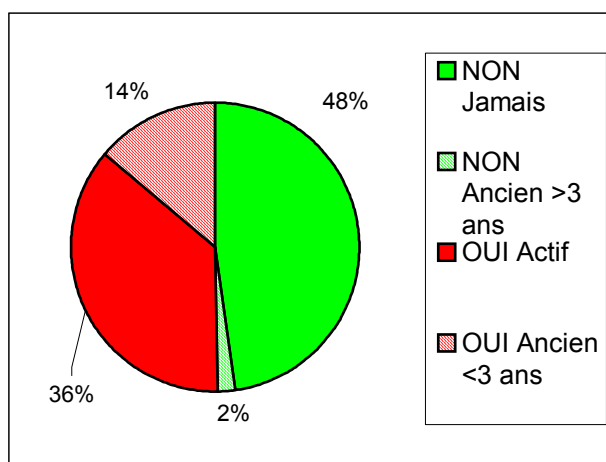
- Exposition à la chaleur



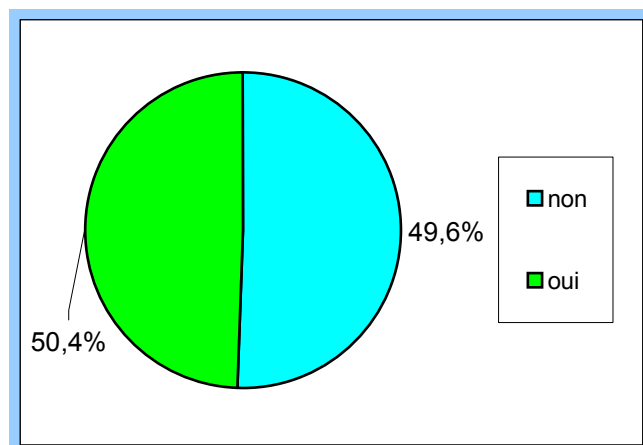
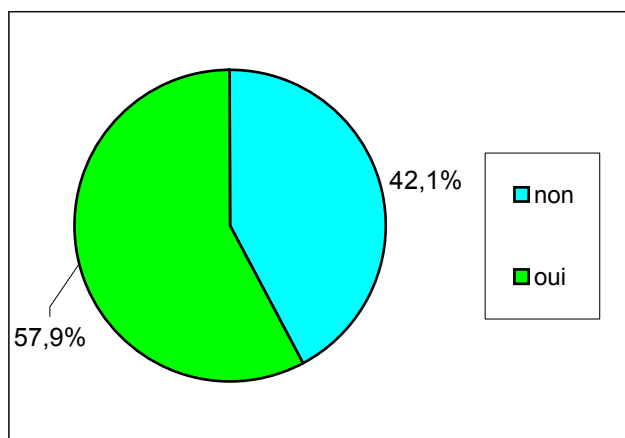
- Traitement



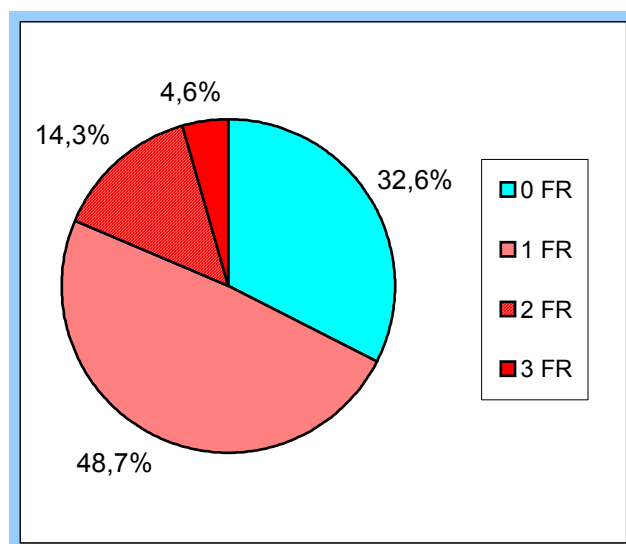
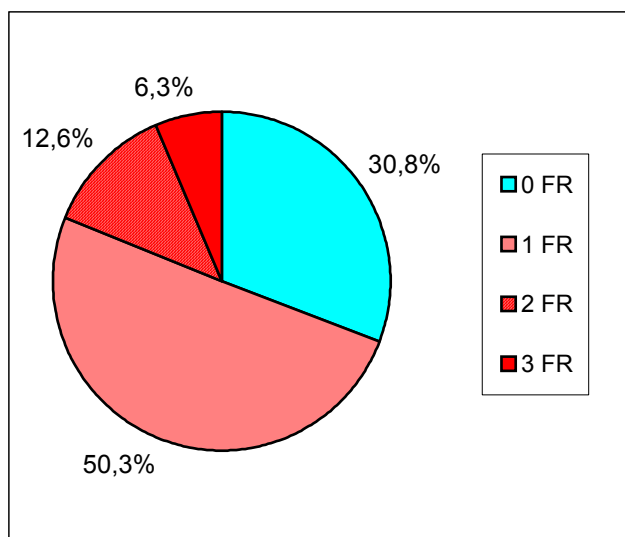
-Tabagisme



-Consommation régulière de fruits et légumes frais



-Association de plusieurs facteurs de risque



Annexe 4 :Procédure de coloration des lames selon la technique TUNEL

 Biologie de la reproduction	MODE OPERATOIRE Fragmentation ADN spermatique : Technique TUNEL	Diffusion par Biologie de la reproduction	MO- ANALYS- 022-A
	Rubrique de classement interne : <i>SPERMIOLOGIE</i>	Page 1/7	Rev A MAJ

1. Objet/Objectif :

La spermatogenèse est le processus complexe de prolifération et de différenciation des spermatozoïdes à partir de cellules souches associé au phénomène d'apoptose lequel limite le nombre de cellules germinales et permet la destruction des spermatozoïdes présentant des anomalies.

Des recherches relativement récentes laissent supposer que des anomalies de l'ADN spermatique, notamment une fragmentation liée à une apoptose augmentée pourraient jouer sur l'issue des tentatives d'AMP, notamment sur le taux de développement au stade blastocyste ainsi que sur le taux de grossesse plus que sur la fécondation ou le développement précoce de l'embryon.

2. Domaine d'application :

Ce mode opératoire concerne le secteur spermologie et le secteur fécondation *in vitro*. Il s'adresse aux biologistes, aux internes et aux techniciennes.

3. Contenu :

3.1 Principe

TUNEL: Tdt (Terminal deoxynucleotidyl Transferase)-mediated dUTP (deoxyuridine triphosphate)-digoxigenine Nick End Labelling.

Ajout de nucléotides (dUTP) marqués à la digoxigénine aux sites de coupure et aux extrémités 3'OH des fragments d'ADN (simple et double brins).

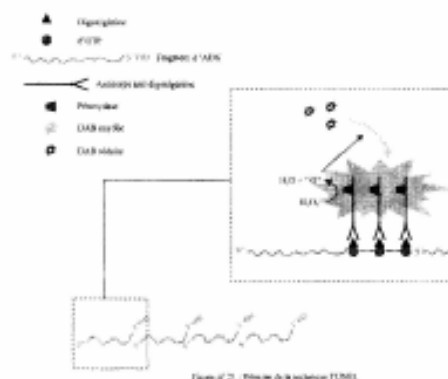
Amplification du signal par l'utilisation d'anticorps anti-digoxigénine marqués par une peroxydase qui se fixent sur la digoxigénine des nucléotides.

Révélation de la peroxydase par ajout de substrat chromogène (DAB : DiAminoBenzidine) qui donne une coloration marron.

Contre-coloration par l'hématoxyline (coloration bleue) des brins d'ADN non fragmentés c'est-à-dire ne contenant pas de nucléotides marqués à la digoxigénine.

REDACTEUR	Visa	VERIFICATEUR	Visa	APPROBATEUR	Visa	Date Application
		Groupe de vérificateurs à préciser		A préciser en fonction du domaine d'application retenu		

 Biologie de la reproduction	MODE OPERATOIRE Fragmentation ADN spermatique : Technique TUNEL	Diffusion par Biologie de la reproduction	MO- ANALYS- 022-A
	Rubrique de classement interne : <i>SPERMIOLOGIE</i>	Page 1/7	Rev A MAJ



3.2 Matériel

- Gants
- Stylo à cire hydrophobe : Dakopen®
- Lames et lamelles en verre
- Papier aluminium
- Eprouvettes : 500 et 1 000mL
- Pipette graduée : 5 mL
- Micropipettes ajustables (0,5 - 10µL ; 5 - 50µL ; 20 - 200µL ; 100 - 1000µL)
- Cônes pour micropipettes
- Tubes à hémolyse avec bouchon
- Piluliers
- Porte-lames
- Parafilm
- Chambre humide
- Piluliers
- Portoir pour tubes
- Pack de gel à -20°C permettant la conservation de l'enzyme hors congélateur
- Microscope optique à grossissement X 100 immersion
- Agitateur avec plateau porte-lame rotatif
- Congélateur -20°C
- Chambre froide

REDACTEUR	Visa	VERIFICATEUR	Visa	APPROBATEUR	Visa	Date Application
		Groupe de vérificateurs à préciser		A préciser en fonction du domaine d'application retenu		

 Biologie de la reproduction	MODE OPERATOIRE Fragmentation ADN spermatique : Technique TUNEL	Diffusion par Biologie de la reproduction	MO-ANALYS-022-A
	Rubrique de classement interne : SPERMIOLOGIE	Page 1/7	Rev A MAJ

3.3 Réactifs

- Solution Méthanol / Acide acétique glacial (2/3 ; 1/3), préparation extemporanée
- PBS 10X, conservation à +4°C pendant plusieurs semaines
- PBS 1X : dilution au 1/10 dans eau distillée, conservation plusieurs semaines à +4°C
- PBS Triton 100X, conservation à +4°C pendant plusieurs semaines
- PBS Triton 1X : dilution au 1/100 dans PBS 1X, conservation plusieurs semaines à +4°C
- H₂O₂ 3% prête à l'emploi (pharmacie), conservation à +4°C
- Hématoxyline de Harris diluée au 1/50^{ème} (conservée à l'obscurité à température ambiante)
- Eau distillée
- Kit Apoptag[®] (une fois le kit ouvert, réactifs se conservent à +4°C, sauf Tdt, Equilibration buffer et Reaction buffer qui se conservent à -20°C)
 - o anticorps anti-digoxigénine marqués à peroxydase
 - o Diaminobenzidine (DAB Substrate et DAB Dilution buffer) (préparation extemporanée: dilution au 1/25 du DAB substrate dans DAB dilution buffer, conservation à l'obscurité jusqu'à utilisation)
 - o Equilibration buffer
 - o Reaction buffer (UTP marqué à digoxigénine)
 - o Stop Reaction (20 mL stop reaction qsp 700 mL ED, +4°C plusieurs semaines)
 - o Tdt (préparation extemporanée: dilution au 1/3 dans reaction buffer sachant qu'il faut 18.5 µl par échantillon, conservation dans la glace jusqu'à utilisation)
- Milieu de montage

3.4 Technique

Précautions :

- Veiller aux conditions de conservation des lames à -20°C
- Veiller à ne jamais laisser sécher les lames entre les différentes opérations
- Elimination du méthanol dans bidons appropriés

Préparation des lames:

REMARQUES PRELIMINAIRES :

- Préparer deux lames par patient
- Déposer un volume compris entre 10 et 60 µL

La quantité de spermatozoïdes (N) déposée doit être comprise entre 5 000 et 200 000

Pour le calcul du nombre de spermatozoïdes (N) :

$$N = \frac{\text{x millions spermatozoïdes/mL}}{\text{volume déposé}}$$

REDACTEUR	Visa	VERIFICATEUR	Visa	APPROBATEUR	Visa	Date Application
		Groupe de vérificateurs à préciser		A préciser en fonction du domaine d'application retenu		

 Biologie de la reproduction	MODE OPERATOIRE Fragmentation ADN spermatique : Technique TUNEL	Diffusion par	MO-ANALYS-022-A
	Rubrique de classement interne : SPERMIOLOGIE	Page 1/7	Rev A MAJ

Pour une quantité de spermatozoïdes entre 50 000 et 200 000 :

- Nettoyer les lames avec de l'alcool, écrire lisiblement au crayon à papier le nom, le prénom, la date.
- Faire un cercle de 1 cm avec le Dakopen sur la lame propre.
- Déposer les spermatozoïdes (dans un volume compris entre 20 et 60 μ L), étaler le dépôt sur la lame avec la pointe du cône.

Pour une quantité de spermatozoïdes entre 5 000 et 50 000 :

- Nettoyer les lames avec de l'alcool, écrire lisiblement au crayon à papier le nom, le prénom, la date.
- Faire un cercle de 0,5 cm avec le Dakopen sur la lame propre.
- Déposer les spermatozoïdes (dans un volume compris entre 10 et 30 μ L), étaler le dépôt sur la lame avec la pointe du cône.

Stockage des lames :

- Les lames sont séchées 24 heures à température ambiante.
- Au bout de 24 heures, elles sont emballées dos à dos avec du papier aluminium.
- Ecrire lisiblement au feutre sur le papier d'aluminium : le nom, le prénom et la date.
- Stocker les lames dans le sachet prévu à cet effet à -20°C .
- Noter dans le cahier le nom, prénom, date et le nombre de lames préparées.

Fixation des lames:

- Plonger les lames dans un bain de méthanol/Acide acétique 20 minutes à température ambiante sous la sorbonne
- Sortir les lames, les égoutter sur une feuille de papier absorbant

Perméabilisation des cellules:

- Plonger les lames 5 min dans bain de PBS triton 1X, à température ambiante sous agitation
- Rinçage rapide à l'eau courante
- Rincer par 2 bains dans PBS 1X à température ambiante sous agitation pendant 5 min
- Déposer 100 μ L de H₂O₂ 3% pendant 10 min à température ambiante sous agitation
- Rincer par 1 bain dans PBS 1X à température ambiante sous agitation pendant 5 min

Elongation de l'ADN:

- Déposer 30 μ L d'Equilibration buffer 10 secondes à température ambiante
- Egoutter
- Ajouter 18.5 μ L de solution de Tdt (préparée extemporanément), recouvrir d'une lamelle plastique et laisser 1h à 37°C dans une chambre humide
- Enlever délicatement la lamelle plastique
- Egoutter
- Ajouter 100 μ L de Stop Reaction dilué et laisser en contact 15 min à température ambiante sous agitation en chambre humide
- Rincer par 2 bains dans PBS 1X sous agitation pendant 5 min

REDACTEUR	Visa	VERIFICATEUR	Visa	APPROBATEUR	Visa	Date Application
		Groupe de vérificateurs à préciser		A préciser en fonction du domaine d'application retenu		

 Biologie de la reproduction	MODE OPERATOIRE Fragmentation ADN spermatique : Technique TUNEL	Diffusion par Biologie de la reproduction	MO- ANALYS- 022-A
	Rubrique de classement interne : <i>SPERMIOLOGIE</i>	Page 1/7	Rev A MAJ

Révélation de l'élongation:

- Egoutter
- Ajouter 20 µL de solution d'anticorps anti-digoxigénine et laisser en contact pendant 30 min à température ambiante en chambre humide obscure et sous agitation.
- Rincer par 2 bains dans PBS 1X sous agitation pendant 5 min

Révélation des sites de marquage:

- Egoutter
- Ajouter 15 µl de solution de DAB diluée et laisser en contact 15 min en chambre humide obscure sous agitation à température ambiante
- Laver par 2 bains dans H₂O distillée à température ambiante sous agitation

Contre-coloration:

- Déposer 100 µl d'hématoxyline de Harris et laisser en contact 3 min à température ambiante sous agitation.
- Laver par 2 bains dans H₂O distillée à température ambiante sous agitation
- Laisser sécher à l'air libre

Montage:

- Déposer une goutte de liquide de montage, puis déposer une lamelle de verre
- Luther

Lecture:

Lecture au microscope optique Objectif x100 à immersion:

Noyau de spermatozoïde marron = ADN fragmenté

Noyau de spermatozoïde bleu-translucide = ADN non fragmenté

On rend un pourcentage après une lecture d'au moins 500 spermatozoïdes.

NB: spermatozoïdes macrocéphales presque toujours de couleur marron.

Les auto-anticorps augmentent l'indice de fragmentation.

Interprétation:

Certaines études qui utilisent un *seuil de positivité à 20%* retrouvent une corrélation négative avec le développement jusqu'au stade blastocyste et le taux de grossesse.

REDACTEUR	Visa	VERIFICATEUR	Visa	APPROBATEUR	Visa	Date Application
		Groupe de vérificateurs à préciser		A préciser en fonction du domaine d'application retenu		

Annexe 5 : Résultats associés à la technique
TUNISI

	Nom Prénom	Age	Type FIV	Rang FIV	%F°	Intensité couleur brune	Indice F°	Ovocytes fécondés/ inséminés	Nb embryons obtenus	Nb embryons transférés	Qualité embryonnaire à J2	Nb blastocystes obtenus	Nb embryons congelés	Issue de grossesse	Rmq
1	GRAI	37	C	4	16	/	/	9/12	8	3	Reg	0	4	0	
2	BEFR	32	ICSI	2	29	/	/	7/16	5	2	Irreg	0	0	1	J2
3	DOCH	27	C	2	57	/	/	10/14	10	2	Irreg	0	5	0	GEU
4	POGE	40	C	4	39	/	/	4/4	3	3	Irreg	0	0	0	
5	LOBE	32	ICSI	4	30	/	/	6/17	5	3	Reg	0	2	0	bH+
6	COIS	39	ICSI	1	31	/	/	1/5	0	échec	0	0	0	0	
7	BOHA	26	C	2	37	/	/	2/4	1	1	Reg	0	0	0	bH+
8	RALY	33	C	1	<1	/	/	2/9	2	2	Reg	0	0	0	
9	AUFA	34	C	2	<1	/	/	13/16	12	2	Reg	0	3	0	FCSP
10	ABKA	37	C	1	9	/	/	9/15	9	2	Reg	0	5	0	
11	GEEM	32	ICSI	1	39	/	/	2/8	2	2	reg/irreg	0	0	0	
12	ROBE	28	ICSI	1	22	/	/	5/8	5	2	Irreg	0	0	1	
13	PELA	33	ICSI	2	68	/	/	6/15	6	3	Irreg	0	0	0	
14	GEVA	38	ICSI	3	28	/	/	6/16	6	3	Irreg	0	0	1	
15	GUST	28	C	2	19	/	/	4/4	4	2	Reg	0	1	0	
16	CCIS	37	C	1	34	/	/	7/8	7	1	Irreg	0	0	0	
17	DELY	32	ICSI	3	40	/	/	7/11	6	2	Reg	0	0	0	bH+
18	BUEM	38	C	2	51	/	/	7/11	7	3	Irreg	0	0	0	
19	CADE	36	C	1	32	/	/	5/5	4	2	Reg	0	0	0	
20	GAIS	40	C	4	28	/	/	3/3	3	3	Reg	0	0	0	
21	BOEM	25	ICSI	4	24	/	/	3/3	3	2	Reg	0	0	0	
22	HURE	37	ICSI	4	9	/	/	2/4	2	2	reg/irreg	0	0	0	bH+
23	DUCE	32	C	2	34	/	/	2/2	2	2	Irreg	0	0	0	
24	CHBE	34	C	1	48	/	/	11/15	11	2	Irreg	0	0	0	
25	CAVA	31	C	3	32	/	/	9/11	9	3	reg/irreg	0	0	1	
26	GAMA	39	ICSI	5	35	/	/	2/7	2	2	reg/irreg	0	0	0	bH+
27	POCH	33	C	1	51	/	/	13/15	13	2	reg/irreg	0	6	1	
28	TUMA	34	ICSI	1	44	/	/	4/7	4	2	Irreg	0	0	0	
29	TELY	32	C	1	36	/	/	7/15	7	2	Reg	0	3	0	FCSP
30	GUDE	31	ICSI	2	8	/	/	3/6	3	2	Irreg	0	0	0	
31	DEDE	27	ICSI	1	12	/	/	6/9	6	2	Reg	0	3	0	

	Nom Prénom	Age	Type FIC	Rang FIV	% F°	Intensité couleur brune	Indice F°	Ovocytes fécondés/ inséminés	Nb embryons obtenus	Nb embryons transférés	Qualité Embryonnaire à J2	Nb blastocystes obtenus	Nb embryons congelés	Issue de Grossesse	Rmq
32	DANU	29	C	1	18	/	/	5/10	5	2	Reg	0	0	0	
33	DELU	30	ICSI	1	21	/	/	12/15	12	échec	Irreg	0	0	0	
34	DEFR	43	C	1	42	/	/	3/5	3	3	Irreg	0	0	1	
35	TRMO	28	ICSI	2	8	/	/	2/4	2	2	Reg	0	0	0	
36	GINA	37	C	1	36	/	/	2/3	2	2	Reg	0	0	0	
37	ISSO	37	C	2	19	/	/	8/8	8	2	Reg	0	3	0	
38	GRCA	34	C	4	34	/	/	11/16	11	3	Reg	0	4	1	
39	RUBE	34	ICSI	3	20	/	/	6/9	6	2	Irreg	0	0	0	FCSP
40	COSO	35	C	1	2	/	/	3/6	3	2	reg/irreg	0	0	1	
41	BLAL	30	C	1	11	/	/	7/9	5	2	reg/irreg	0	0	1	
42	LEEL	40	C	1	24	/	/	10/13	10	2	Reg	0	4	1	
43	RAMA	35	C	1	30	/	/	2/4	2	2	Irreg	0	0	0	
44	LUSE	29	ICSI	1	49	/	/	2/5	2	2	Reg	0	0	0	
45	LUMA	37	C	5	35	65-32-3-0	38	11/14	11	3	Reg	0	4	1	
46	GAVE	34	C	1	38	62-32-6-0	44	11/15	11	2	Reg	0	8	1	
47	HURE2	32	ICSI	3	20	80-9-11-0	31	6/7	6	2	Reg	0	3	0	
48	GAVI	29	ICSI	5	62	38-21-38-3	106	2/10	2	2	Irreg	0	0	0	
49	GAAD	33	C	1	33	67-13-20-0	53	2/11	2	2	Irreg	0	0	0	
50	LEBE	36	C	1	22	78-11-11-0	33	10/12	10	2	Reg	0	3	0	
51	MIMA	33	C	1	18	82-13-5-0	23	5/11	5	2	reg/irreg	0	0	1	
52	AUCA	33	C	2	37	63-28-8-1	47	7/11	7	2	Reg	0	4	1	
53	PEAN	33	C	2	35	65-23-10-2	49	12/16	12	2	Reg	0	6	0	
54	GILU	34	C	2	39	61-18-18-3	63	14/16	14	2	Reg	0	0	1	
55	ANME	35	C	1	51	49-17-22-12	97	10/12	10	1	Reg	1	0	0	
56	LNDE	32	C	2	14	86-7-6-1	22	10/10	10	2	Reg	0	6	0	
57	GRAG	38	C	1	6	94-3-3-0	9	1/8	1	1	Reg	0	0	0	
58	HEVA	34	C	2	13	87-6-7-0	20	11/12	11	2	Reg	0	4	0	
59	VIFL	37	C	1	30	70-20-10-0	40	2/2	2	2	Reg	0	0	0	
60	KAKA	31	ICSI	1	24	76-16-8-0	32	10/11	10	2	Reg	1	1	0	
61	CANA	34	C	1	18	72-16-11-1	41	9/9	9	2	Reg	0	3	1	

	Nom Prénom	âge	Type FIC	Rang FIV	% F°	Intensité couleur brune	Indice F°	Ovocytes fécondés/ inséminés	Nb embryons obtenus	Nb embryons transférés	Qualité Embryonnaire à J2	Nb blastocystes obtenus	Nb embryons congelés	Issue de grossesse	Rmq
62	LPCL	33	C	2	36	64-24-11-1	49	6/13	5	2	Reg	0	0	0	
63	AYSA	31	C	3	<1		1	0/1	0	0	0	0	0	0	
64	TAPA	33	C	2	5		5	4/14	3	2	Reg	1	6	0	
65	VRMA	31	C	1	3		3	11/16	11	2	reg/irreg	1	2	0	
66	ALVE	37	C	2	<1		1	12/13	11	2	Reg	0	0	0	
67	BLCH	32	C	4	<1		1	9/14	8	3	Irreg	0	0	0	
68	DECA	30	C	1	40	60-22-17-1	59	10/11	9	2	Irreg	0	0	0	
69	FEAX	33	C	1	49	51-19-18-12	91	3/5	3	2	reg/irreg	0	1	1	
70	DOCH2	27	C	3	49	51-4-30-15	109	9/18	9	2	Reg	0	3	0	
71	BOKA	33	C	1	39	61-28-11-0	50	3/5	3	2	Irreg	0	0	0	
72	HORO	30	C	2	<1		1	6/8	6	2	Reg	0	0	0	
73	MEKA	36	C	2	47	53-10-22-15	109	6/9	6	2	reg	0	2	0	bH+
74	MAMA	30	C	1	24	76-9-14-1	39	5/23	5	2	reg	0	0	0	
75	MOSA	37	C	1	34	66-13-18-3	58	8/9	8	2	reg	0	3	0	bH+
76	SACH	35	C	1	38	62-4-26-8	54	4/4	4	2	0	0	0	0	
77	MACO	30	C	1	25	75-7-17-1	44	15/16	15	2	0	0	0	0	
78	GRAG2	38	C	2	12	88-7-3-2	19	0/3	0	0	reg	2	0	0	bH+
79	THAL	34	C	2	20	80-11-7-2	31	11/23	11	0	reg	0	0	0	bH+
80	MALA	40	C	2	18	82-9-8-1	28	11/14	11	2	reg	0	0	0	
81	MESY	40	C	3	30	70-12-11-7	55	3/10	3	3	reg/irreg	0	0	0	
82	KOMU	30	C	1	20	80-7-10-3	36	6/8	5	2	reg	0	0	1	
83	DEMI	29	C	2	13	87-7-6-0	19	13/15	13	2	reg	0	5	0	
84	LCKA	31	C	2	26	74-18-7-1	35	2/4	2	2	reg	0	3	0	
85	DAMC	37	C	1	21	79-11-8-2	33	16/21	15	2	irreg	0	0	1	
86	CHNA	35	C	1	14	86-7-5-2	23	10/20	10	2	reg	0	0	0	
87	LJMA	36	C	1	28	72-13-8-7	52	11/15	11	2	reg	4	3	0	
88	BEAL	28	C	1	34	66-6-22-6	68	12/17	12	2	reg	0	3	0	bH+
89	RAVA	27	C	2	15	85-7-3-5	28	8/10	8	1	reg	0	7	1	
90	LEST	31	C	1	32	68-21-10-1	44	9/15	9	2	reg	0	4	0	
91	LTSO	28	C	1	59	41-25-32-2	93	12/17	12	2	reg	0	7	1	

	Nom Prénom	âge	Type FIC	Rang FIV	% F°	Intensité couleur brune	Indice F°	Ovocytes fécondés/ inséminés	Nb embryons obtenus	Nb embryons transférés	Qualité Embryonnaire à J2	Nb blastocystes obtenus	Nb embryons congelés	Issue de G	Rmq
92	AMMA	38	C	2	22	78-4-18-0	40	9/14	3	2	reg	1	1	0	
93	GUSO	34	C	2	25	75-8-11-6	48	7/21	7	2	irreg	1	1	0	bH+
94	MIMA	28	C	1	28	72-11-16-1	46	3/5	3	2	reg	1	0	0	
95	PEVA	33	C	1	24	76-12-9-3	57	1/3	1	1	reg	0	0	0	
96	COOL	34	C	1	18	82-11-7-0	25	0/9	0	0	0	0	0	0	
97	LMFR	35	C	1	31	69-16-13-2	48	4/5	2	2	reg/irreg	0	0	1	
98	LANA	33	C	2	17	83-12-4-1	23	0/4	0	0	0	0	0	0	
99	BALA	38	C	5	20	80-12-6-2	30	4/12	4	3	irreg	0	0	0	
100	GA	32	C	1	19	71-16-12-1	53	8/10	8	2	reg	0	3	1	
101	LPCL	33	C	3	<1		1	3/10	3	3	irreg	0	0	1	
102	GUFR	37	C	1	<1		1	7/12	7	2	reg	0	1	0	bH+
103	RECL	31	C	2	50	50-26-21-3	77	9/13	9	1	reg/irreg	1	0	0	
104	BELA	28	C	2	26	74-19-7-0	33	16/17	16	2	reg	0	9	0	
105	LBKA	31	C	1	17	83-13-4-0	21	8/11	8	2	irreg	0	0	1	
106	MIMU	44	C	1	17	83-11-6-0	23	10/20	10	2	reg	0	3	0	
107	GUKA	27	C	1	14	86-11-3-0	17	4/8	4	2	irreg	0	0	1	
108	LASE	34	C	2	15	85-2-11-2	30	10/12	10	2	reg	0	8	0	
109	RAMA	25	C	2	24	76-8-10-6	36	6/7	6	2	reg	0	0	1	
110	CHCA	36	C	3	36	64-12-12-12	72	3/4	3	2	reg	0	0	0	

BIBLIOGRAPHIE

Agarwal, A. & Said, T. M. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* **9**, 331-45.

Agarwal, A., Saleh, R. A. & Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* **79**, 829-43.

Aitken, R. J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J. P., Milne, P., Jennings, Z. & Irvine, D. S. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* **59**, 1037-46.

Arabi, M. & Shareghi, B. (2005). Anti-fertility effect of nicotine. *Zhonghua Nan Ke Xue* **11**, 323-30.

Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J. & Meyers, S. A. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl* **24**, 621-8.

Benchabib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H. & Guerin, J. F. (2003). Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* **18**, 1023-8.

Benhamou, E., Benhamou, S., Auquier, A. & Flamant, R. (1989). Changes in patterns of cigarette smoking and lung cancer risk: results of a case-control study. *Br J Cancer* **60**, 601-4.

Berthiller, J. & Sasco, A. J. (2005). Smoking (active or passive) in relation to fertility, medically assisted procreation and pregnancy. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **34 Spec No 1**, 3S47-54.

Brydoy, M., Fossa, S. D., Klepp, O., Bremnes, R. M., Wist, E. A., Wentzel-Larsen, T. & Dahl, O. (2005). Paternity following treatment for testicular cancer. *J Natl Cancer Inst* **97**, 1580-8.

Bujan, L., Daudin, M., Charlet, J. P., Thonneau, P. & Mieusset, R. (2000). Increase in scrotal temperature in car drivers. *Hum Reprod* **15**, 1355-7.

Carrell, D. T., Liu, L., Peterson, C. M., Jones, K. P., Hatasaka, H. H., Erickson, L. & Campbell, B. (2003). Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* **49**, 49-55.

Clavel-Chapelon, F., Paoletti, C. & Benhamou, S. (1997). Smoking cessation rates 4 years after treatment by nicotine gum and acupuncture. *Prev Med* **26**, 25-8.

Clavel, F., Benhamou, S. & Flamant, R. (1987). Nicotine dependence and secondary effects of smoking cessation. *J Behav Med* **10**, 555-8.

de Lamirande, E. & Gagnon, C. (1993). Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril* **59**, 1291-5.

De Rosa, M., Zarrilli, S., Paesano, L., Carbone, U., Boggia, B., Petretta, M., Maisto, A., Cimmino, F., Puca, G., Colao, A. & Lombardi, G. (2003). Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod* **18**, 1055-61.

Dietrich, G. J., Szpyrka, A., Wojtczak, M., Dobosz, S., Goryczko, K., Zakowski, L. & Ciereszko, A. (2005). Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* **64**, 1809-22.

Duran, E. H., Morshedi, M., Taylor, S. & Oehninger, S. (2002). Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* **17**, 3122-8.

Evenson, D. P. & Wixon, R. (2005). Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA((R))). *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 532-7.

Giwerzman, A., Richthoff, J., Hjollund, H., Bonde, J. P., Jepson, K., Frohm, B. & Spano, M. (2003). Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril* **80**, 1404-12.

Golec, J., Hanke, W. & Dabrowski, S. (2003). Fertility and occupational exposure to pesticides. *Med Pr* **54**, 465-72.

Greco, E., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S. & Tesarik, J. (2005a). Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* **26**, 349-53.

Greco, E., Romano, S., Iacobelli, M., Ferrero, S., Baroni, E., Minasi, M. G., Ubaldi, F., Rienzi, L. & Tesarik, J. (2005b). ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod* **20**, 2590-4.

Grove, G. L., Grove, M. J., Bates, N. T., Wagman, L. M. & Leyden, J. J. (2002). Scrotal temperatures do not differ among young boys wearing disposable or reusable diapers. *Skin Res Technol* **8**, 260-70.

Guerin, J. F. & Benchaib, M. (2004). Assays for assessment of sperm DNA integrity: relationships with fertility and conceptus quality. *Gynecol Obstet Fertil* **32**, 799-802.

Guerin, P., Matillon, C., Bleau, G., Levy, R. & Menezo, Y. (2005). Impact of sperm DNA fragmentation on ART outcome. *Gynecol Obstet Fertil* **33**, 665-8.

Henkel, R., Kierspel, E., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Schill, W. B. & Kruger, T. F. (2003). DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online* **7**, 477-84.

Huang, C. C., Lin, D. P., Tsao, H. M., Cheng, T. C., Liu, C. H. & Lee, M. S. (2005). Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* **84**, 130-40.

Hull, M. G., North, K., Taylor, H., Farrow, A. & Ford, W. C. (2000). Delayed conception and active and passive smoking. The Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood Study Team. *Fertil Steril* **74**, 725-33.

Isojarvi, J. I., Lofgren, E., Juntunen, K. S., Pakarinen, A. J., Paivansalo, M., Rautakorpi, I. & Tuomivaara, L. (2004). Effect of epilepsy and antiepileptic drugs on male reproductive health. *Neurology* **62**, 247-53.

Isojarvi, J. I., Tauboll, E. & Herzog, A. G. (2005). Effect of antiepileptic drugs on reproductive endocrine function in individuals with epilepsy. *CNS Drugs* **19**, 207-23.

Jiao, Z., Zhuang, G., Zhou, C., Xu, Y., Liang, X., Li, L. & Deng, M. (2002). Influence of advanced age on the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **37**, 223-6.

John, U., Riedel, J., Rumpf, H. J., Hapke, U. & Meyer, C. (2006). Associations of perceived work strain with nicotine dependence in a community sample. *Occup Environ Med* **63**, 207-11.

Juriscova, A., Casper, R. F., MacLusky, N. J. & Librach, C. L. (1996a). Embryonic human leukocyte antigen-G expression: possible implications for human preimplantation development. *Fertil Steril* **65**, 997-1002.

Juriscova, A., Casper, R. F., MacLusky, N. J., Mills, G. B. & Librach, C. L. (1996b). HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 161-5.

Krassas, G. E. & Pontikides, N. (2005). Gonadal effect of radiation from ¹³¹I in male patients with thyroid carcinoma. *Arch Androl* **51**, 171-5.

Levy, R. & Seifer-Aknan, I. (2001). Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization. *Ann Biol Clin (Paris)* **59**, 531-45.

Loft, S., Kold-Jensen, T., Hjollund, N. H., Giwercman, A., Gyllemborg, J., Ernst, E., Olsen, J., Scheike, T., Poulsen, H. E. & Bonde, J. P. (2003). Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum Reprod* **18**, 1265-72.

Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J. G. & Casper, R. F. (1998a). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* **13**, 896-900.

Lopes, S., Sun, J. G., Jurisicova, A., Meriano, J. & Casper, R. F. (1998b). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* **69**, 528-32.

Luderer, U., Bushley, A., Stover, B. D., Bremner, W. J., Faustman, E. M., Takaro, T. K., Checkoway, H. & Brodtkin, C. A. (2004). Effects of occupational solvent exposure on reproductive hormone concentrations and fecundability in men. *Am J Ind Med* **46**, 614-26.
Marchetti, C. & Marchetti, P. (2005). Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology. *Gynecol Obstet Fertil* **33**, 669-77.

Matsuda, Y. & Tobari, I. (1989). Repair capacity of fertilized mouse eggs for X-ray damage induced in sperm and mature oocytes. *Mutat Res* **210**, 35-47.

Morris, I. D. (2002). Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* **25**, 255-61.

Morris, I. D., Ilott, S., Dixon, L. & Brison, D. R. (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* **17**, 990-8.

Moustafa, M. H., Sharma, R. K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M. A., Thomas, A. J., Jr. & Agarwal, A. (2004). Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* **19**, 129-38.

Muratori, M., Maggi, M., Spinelli, S., Filimberti, E., Forti, G. & Baldi, E. (2003). Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl* **24**, 253-62.

Muthusami, K. R. & Chinnaswamy, P. (2005). Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil Steril* **84**, 919-24.

Peto, R., Darby, S., Deo, H., Silcocks, P., Whitley, E. & Doll, R. (2000). Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *Bmj* **321**, 323-9.

Pina-Guzman, B., Solis-Heredia, M. J. & Quintanilla-Vega, B. (2005). Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicol Appl Pharmacol* **202**, 189-98.

Recio, R., Robbins, W. A., Borja-Aburto, V., Moran-Martinez, J., Froines, J. R., Hernandez, R. M. & Cebrian, M. E. (2001). Organophosphorous pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy. *Environ Health Perspect* **109**, 1237-40.

Reijo, R., Alagappan, R. K., Patrizio, P. & Page, D. C. (1996). Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* **347**, 1290-3.

- Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G. C., Mariethoz, E., Tarozzi, N. & Bizzaro, D. (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* **66**, 1061-7.
- Sakkas, D., Urner, F., Bianchi, P. G., Bizzaro, D., Wagner, I., Jaquenoud, N., Manicardi, G. & Campana, A. (1996). Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* **11**, 837-43.
- Sakkas, D., Urner, F., Bizzaro, D., Manicardi, G., Bianchi, P. G., Shoukir, Y. & Campana, A. (1998). Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* **13 Suppl 4**, 11-9.
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Nada, E. A., El-Tonsy, M. H., Sharma, R. K., Meyer, A., Nelson, D. R. & Thomas, A. J. (2003). Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* **79 Suppl 3**, 1597-605.
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Sharma, R. K., Nelson, D. R. & Thomas, A. J., Jr. (2002). Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* **78**, 491-9.
- Sanchez-Pena, L. C., Reyes, B. E., Lopez-Carrillo, L., Recio, R., Moran-Martinez, J., Cebrian, M. E. & Quintanilla-Vega, B. (2004). Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol* **196**, 108-13.
- Schover, L. R. (2005). Sexuality and fertility after cancer. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 523-7.
- Schover, L. R., Rybicki, L. A., Martin, B. A. & Bringelsen, K. A. (1999). Having children after cancer. A pilot survey of survivors' attitudes and experiences. *Cancer* **86**, 697-709.
- Seli, E., Gardner, D. K., Schoolcraft, W. B., Moffatt, O. & Sakkas, D. (2004). Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* **82**, 378-83.
- Sepaniak, S., Forges, T., Fontaine, B., Gerard, H., Foliguet, B., Guillet-May, F., Zaccabri, A. & Monnier-Barbarino, P. (2004). Negative impact of cigarette smoking on male fertility: from spermatozoa to the offspring. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **33**, 384-90.
- Sepaniak, S., Forges, T. & Monnier-Barbarino, P. (2005). Consequences of cigarette smoking on male fertility. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **34 Spec No 1**, 3S102-11.
- Sergerie, M., Bleau, G., Teule, R., Daudin, M. & Bujan, L. (2005a). Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility. *Gynecol Obstet Fertil* **33**, 89-101.
- Sergerie, M., Laforest, G., Bujan, L., Bissonnette, F. & Bleau, G. (2005b). Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* **20**, 3446-51.
- Sheiner, E. K., Sheiner, E., Hammel, R. D., Potashnik, G. & Carel, R. (2003). Effect of occupational exposures on male fertility: literature review. *Ind Health* **41**, 55-62.
- Sheynkin, Y., Jung, M., Yoo, P., Schulsinger, D. & Komaroff, E. (2005). Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Hum Reprod* **20**, 452-5.

Sierens, J., Hartley, J. A., Campbell, M. J., Leathem, A. J. & Woodside, J. V. (2001). Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutat Res* **485**, 169-76.

Sierens, J., Hartley, J. A., Campbell, M. J., Leathem, A. J. & Woodside, J. V. (2002). In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm. *Teratog Carcinog Mutagen* **22**, 227-34.

Silver, E. W., Eskenazi, B., Evenson, D. P., Block, G., Young, S. & Wyrobek, A. J. (2005). Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in healthy nonsmoking men. *J Androl* **26**, 550-6.

Sun, J. G., Jurisicova, A. & Casper, R. F. (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* **56**, 602-7.

Tesarik, J., Greco, E. & Mendoza, C. (2004). Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* **19**, 611-5.

Thomas, A. K. & Forrest, M. S. (1980). Infertility: a review of 291 infertile couples over eight years. *Fertil Steril* **34**, 106-11.

Tomlinson, M. J., Moffatt, O., Manicardi, G. C., Bizzaro, D., Afnan, M. & Sakkas, D. (2001). Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* **16**, 2160-5.

Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Irvine, D. S. & Aitken, R. J. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* **13**, 1429-36.

Virro, M. R., Larson-Cook, K. L. & Evenson, D. P. (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. *Fertil Steril* **81**, 1289-95.

Wee, S. L., Suckling, D. M., Burnip, G. M., Hackett, J., Barrington, A. & Pedley, R. (2005). Effects of substerilizing doses of gamma radiation on adult longevity and level of inherited sterility in *Teia anartoides* (Lepidoptera: Lymantriidae). *J Econ Entomol* **98**, 732-8.

Zitzmann, M., Rolf, C., Nordhoff, V., Schrader, G., Rickert-Fohring, M., Gassner, P., Behre, H. M., Greb, R. R., Kiesel, L. & Nieschlag, E. (2003). Male smokers have a decreased success rate for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* **79 Suppl 3**, 1550-4.

DrugDex editorial staff eds. Drug-induced sexual dysfunction and selective serotonin reuptake inhibitor-induced sexual dysfunction, Denver, Colorado
The science of air: concepts and applications, F.R. Spellman, Ed. Technomic Publishing Company (Lancaster, Pennsylvania, USA, 199)

Nom: CLOUET-LESKE

Prénom : Anne-Claire

Titre de la Thèse :

FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET SPERMATOGENESE :

Application de la technique TUNEL pour l'évaluation du taux de fragmentation de l'ADN du spermatozoïde.

Résumé :

Au cours de la spermatogenèse, le remodelage de la chromatine nucléaire du spermatozoïde constitue une étape importante dans l'acquisition du pouvoir fécondant. Des cassures ou fragmentations de l'ADN des spermatozoïdes, notamment dues à un stress oxydatif, sont fréquemment rapportées chez les patients infertiles. Dans la mesure où le tabac est une source importante de radicaux libres oxydants, nous avons cherché à évaluer l'impact de la consommation tabagique sur les spermatozoïdes. Au cours d'une enquête menée au sein du laboratoire de Biologie de la Reproduction auprès de 389 hommes infertiles, nous avons constaté une sur-représentation significative des fumeurs. Les résultats de notre travail n'ont pas permis d'établir de lien formel entre la consommation du tabac et l'altération nucléaire des spermatozoïdes. Malgré la mise en évidence d'une corrélation négative significative entre la qualité embryonnaire et l'intensité de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, cette évaluation de l'altération nucléaire des gamètes n'est pas, à la lumière de nos résultats, un marqueur satisfaisant de la qualité du spermatozoïde et du conceptus.

MOTS CLES : Infertilité, Spermatozoïde, Stress oxydatif, Fragmentation de l'ADN, Tabac, TUNEL.

Composition du Jury :

Président : Mme Berthe-Marie IMBERT, Professeur - Faculté de Pharmacie de Nantes

Assesseurs : Mr Paul BARRIERE, Professeur - Hôpital de la Mère et de l'Enfant, CHU de Nantes

Mr Miguel JEAN, MCU-PH - Hôpital de la Mère et de l'Enfant, CHU de Nantes

Mme Sophie MIRALLIE, Praticien Hospitalier - Hôpital de la Mère et de l'Enfant, CHU de Nantes

Adresse de l'auteur : 18, rue de Briord – 44000 Nantes