

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie-Biologie Cellulaire et Moléculaire



N° d'Ordre :

N° de Série :

Thèse

**Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3ème Cycle LMD
Option : Biologie et Santé**

Présentée par :

OUNIS LEYLA

Thème

**Les anomalies morphologiques responsables des infertilités masculines
dans l'Est Algérien : Aspect épidémiologique et génétique**

Soutenu le/..../2014

Devant le Jury :

Président :	A. ROUABAH	Professeur	Université Constantine 1
Directrice de thèse :	L. ROUABAH	Professeur	Université Constantine 1
Examineurs :	C. TOUIL-Boukoffa	Professeur	U. S. T. B. H. Alger
	C. LAMDAOUI	Professeur	Université Constantine 3
	F. RAY	Professeur	Université De Grenoble
Invité :	ZOGHMAR	MA	Clinique Ibn Rochd



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Année Universitaire 2014-2015

Remerciements et dédicaces



Optimized using
trial version
www.balesio.com

AU TOUT PUISSANT ALLAH :

Le grand et le Miséricordieux qui m'a aidé et muni de force et de
patience pour réaliser cette thèse.

Merci de m'avoir tenu en bonne santé pour la réalisation de cette
thèse.

Merci de m'avoir donné la force et le courage d'entreprendre ce
travail.

Que gloire et louanges vous soient consacrées pour l'éternité.



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement mon encadreur de thèse Madame le Professeur **Rouabah L.**, pour son savoir faire, son soutien moral, sa disponibilité, sa gentillesse et le degré d'humanisme dont elle fait preuve. Elle n'a pas cessé de me guider et me donner des conseils tout au long de mon parcours. Veuillez trouver ici, madame, l'expression de ma profonde gratitude et de l'estime que je porte pour vous.

Je remercie sincèrement **Pr Pierre Ray**, responsable du laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, CHU Grenoble, pour l'honneur qu'il m'a fait en m'acceptant dans son laboratoire mais également pour la confiance dont il m'honore. Son dynamisme et sa disponibilité m'ont beaucoup apporté. Je ne saurais assez dire l'honneur et le plaisir de travailler à ses côtés.

Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Je suis profondément reconnaissante au **Dr Zoghmar A.** médecin biologiste de la clinique Ibn Rochd Constantine de m'avoir accepté au sein de son service de PMA. Il n'a pas cessé de me prodiguer des conseils d'une valeur prépondérante.

J'adresse mes vifs remerciements au Dr Benbouhedja le directeur de la clinique Ibn Rochd qui m'a autorisé à réaliser ce travail au sein de la clinique, je le remercie pour l'intérêt réservé à la recherche.



Les remerciements et ma gratitude vont aussi au **Pr Rouabah A.** pour ce travail et d'en présider le jury. Soyez assuré de mon entière reconnaissance.

Pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter de siéger dans le jury de cette
thèse, je tiens à remercier

Le Professeur **PIERRE RAY**

Le Professeur **TOUIL-BOUKOFFA C.**

Le Professeur **LAMDAOUI M.C.**

Je tiens à remercier le personnel de la clinique Ibn Rochd Constantine , et en
particulier MERIEM et AMEL merci beaucoup pour tout ce que vous m'avez
offert comme aide sans oublier les techniciens Amina, Hamza, Halla,
Belkacem pour l'implication dans ce travail.

Je remercie Dr Madkour I., Dr Bellil I. et Pr Khelifi D. pour leur soutien.

Je tiens également à remercier l'équipe du laboratoire de Biochimie et
génétique moléculaire du CHU Grenoble en particulier Delphine Martinez,
Charles Coutton, Thomas Karaouzene, Sandra Yassine et Cristophe Arnaut,
qui m'ont soutenue et orientée durant mon stage au sein du laboratoire.



DEDICACES

Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire :

A mon très cher Papa Mohamed :

Ce modeste travail, qui est avant tout le tien, n'est que la consécration de tes grands efforts et tes immenses sacrifices. Sans toi je ne saurais arriver où je suis. J'espère rester toujours digne de ton estime. Puisse Dieu tout puissant te préserve du mal, te comble de santé, de bonheur et t'accorder une longue et heureuse vie afin que je puisse te rendre un minimum de ce que je te dois. Tes prières ont été pour moi d'un grand soutien moral tout au long de mes études. Tu es un papa merveilleux qui est toujours là quand j'en ai besoin et se met en quatre s'il le faut. Quelques lignes ne suffissent pas à faire une longue et belle phrase digne de toi alors juste MERCI, pour tout.

A la mémoire de ma très chère Maman Houria :

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, la profondeur de mon amour, le respect, la reconnaissance.

Je te dédie le fruit de ton amour, de ta tendresse et de ta patience même si je sais qu'aucune dédicace ne saurait exprimer la profondeur de ma reconnaissance.

A toi mère, l'être le plus cher sur terre qui m'a tout donné sans compter. A la

bo : 'ai toujours puisé soutien, courage et persévérance. Ta
sont sans limites. En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes
rêves.



À mon fiancé Kheireddine, un énorme merci pour ta patience, ton écoute, tes conseils et ta présence tout au long de cette thèse. Je n'aurai jamais assez de ces quelques lignes dans ce manuscrit pour te remercier.

À ma belle-mère, qui m'a accueillie si chaleureusement et dont le soutien est constant.

À ma famille, grâce à qui j'en suis là aujourd'hui, parce que vous avez toujours cru en moi et m'avez soutenue. Vous avez tous contribué à votre manière à cette réussite... Je vous aime.

À ma très chère sœur **Amel**, ton soutien moral me restera toujours en mémoire. Je te souhaite beaucoup de succès dans ta vie et surtout beaucoup de joie et de bonheur.

A mes très chères sœurs "Amira et Sarra" et mes très chers frères "Mourad et Allaeddine" et « Souheila, Houda, Nadia » et les petites « Yasmine, Sérine, Manissa » et Mohamed Jawed.

Tous les mots n'expriment pas mon amour et ma gratitude pour vous. Vous qui m'avez soutenu tout au long de mon parcours.

Que Dieu vous donne santé et vous garde, et vous procure bonheur, et grand succès.

Spéciale dédicace à ma tante et ma cousine Loubna. Je ne sais comment vous remercier pour l'aide précieuse que vous m'avez apportée lors de mes étu
ace ne saurait vous témoigner de ma gratitude et de mon estime.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Merci à vous tous.

LISTE DES ABREVIATIONS

AURKC	Aurora Kinase C
A	Asthénospermie
ABP	Androgen Binding Protein
ACBD	Agénésie Congénitale Bilatérale des Déférents
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AT	Asthéno-Tératospermie
AZF	Azoospermic Factor
Azoo	Azoospermie
BET	Bromure d'ETidium
BHCG	β Human Chorionic Gonadotropin
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
ddNTPs	Didésoxyribonucléotides
dNTPs	Désoxyribonucléotides
DO	Densité Optique
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
FISH	Hybridation In Situ
FIV	Fécondation In Vitro
FSH	Follicule Stimulating Hormone.
Gn-RH	Realising-Hormone
HPOR	Hyperspermie+Hyperspermie
HTA	Hypertension Artérielle
IAM	Infirmités Multiples
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection
IMC	Indice de Masse Corporel



Optimized using
trial version
www.balesio.com

IR	Irrégulier
LCR	Low Copy Repeat
LH	Hormone Lutéinisante
M	Multiple
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
NAHR	Recombinaison Homologue Non Allélique
O	Oligospermie
OA	Oligo-Asthénospermie
OAT	Oligo-Asthéno-Tératozoospermie
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Pièce Intermédiaire
Pk	Protéinase K
PMA	Procréation Médicalement Assistée
R	Régulier
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPZ	Spermatozoïde
TE	Tris EDTA



Optimized using
trial version
www.balesio.com

LISTE DES FIGURES

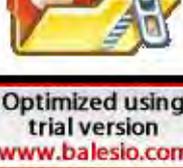
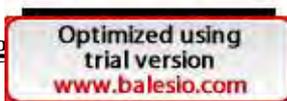
Figure. 1 : L'appareil génital masculin (coupe sagittale)	6
Figure. 2 : La spermatogenèse	9
Figure. 3: Spermiogenèse	10
Figure. 4 : Illustrations du spermatozoïde humain normal ou subnormal, considéré comme normal, et rappel des définitions.	19
Figure. 5 : Anomalies de taille de la tête des spermatozoïdes humains.	20
Figure. 6 : Anomalies de forme et de texture de la tête des spermatozoïdes humains.	21
Figure. 7 : Anomalies de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes humains.	22
Figure. 8 : Anomalies de la pièce principale des spermatozoïdes humains.	23
Figure. 9 : Classification de David 1995 des anomalies morphologiques des spermatozoïdes.	24
Figure. 10 : Photos MEB (X 9000) des spermatozoïdes caractéristiques d'un patient homozygote pour la mutation c144delC	29
Figure. 11 : Exemple d'une famille consanguine montrant la transmission d'une mutation M	30
Figure. 12 : L'absence de la protéine AURKC entraîne un blocage des deux divisions méiotiques.	31
Figure. 13 : Structure génomique au locus DPY19L2	32
Figure. 14 : Mécanisme de NAHR intra-chromatidien	32
Figure. 15 : Mécanisme de NAHR inter-chromatidien ou inter-chromosomique	32
Fig  phorétique de l'amplification de l'exon 3 des 14 patients	54
Fig  phorétique de l'amplification de l'exon 6 des 14 patients	54
Fig  phorétique de l'amplification des exons 2.3.4.7 des 4 patients	54
Figure. 19 : Schéma des deux types de nucléotides triphosphates	57

Figure.20 : Répartition des patients en fonction de la normalité ou la pathogénicité des résultats du spermogramme et spermocytogramme	63
Figure. 21 : Répartition du taux d'infertilité masculine et mixte	64
Figure. 22: Distribution de la fréquence des anomalies spermatiques.	67
Figure. 23 : Distribution des fréquences d'âges de la population étudiée	70
Figure. 24: Répartition des deux types d'infertilité en fonction de l'âge	71
Figure. 25: Répartition des antécédents familiaux en fonction de la consanguinité des Parents	79
Figure. 26: Répartition des cas en fonction des résultats du bilan infectieux	79
Figure. 27: Evolution des paramètres spermatiques en fonction de l'âge	87
Figure. 28 : Répartition des cas en fonction du volume	94
Figure.29 : Répartition des cas en fonction de la numération	95
Figure. 30 : Répartition des cas en fonction de la morphologie des spermatozoïdes	96
Figure. 31 : Répartition des cas pathologiques selon les résultats d'ICSI	98
Figure. 32 : Les trois formes des spermatozoïdes macrocéphales (SM)	106
Figure. 33 : Répartition des patients ayant la macrocéphalie en fonction des résultats de diagnostic génétique	107
Figure. 34: Le diagnostic génétique d'AURKC des exons 3 et 6.	108
Figure. 35: Forme des spermatozoïdes globocéphales	109
Fig  phorétique de la PCR duplex	110
Fig  'A de DPY19L2 exon 1, 17, 22	111

LISTE DES TABLEAUX

Tableau. 1	: Valeurs normales des paramètres du spermogramme.	16
Tableau. 2	: Classification des embryons	45
Tableau. 3	: Réactifs de la PCR	53
Tableau. 4	: Volumes des réactifs utilisés pour une réaction de séquence	56
Tableau. 5	: Produits PCR duplex	61
Tableau. 6	: Résultats globaux des données des spermogrammes et spermocytogrammes	63
Tableau. 7	: Fréquence des spermogrammes et spermocytogrammes pathologiques étudiés par rapport à la totalité des spermogrammes et spermocytogrammes pathologiques	64
Tableau. 8	: Répartition des cas pathologiques selon le degré d'infertilité	65
Tableau. 9	: Répartition des cas en fonction de la durée d'infertilité	65
Tableau. 10	: Répartition de la fréquence des cas pathologiques	66
Tableau. 11	: Répartition des deux types d'infertilité selon les pathologies.	67
Tableau. 12	: Répartition des cas en fonction du lieu d'habitat	68
Tableau. 13	: Répartition des patients en fonction de l'âge	69
Tableau. 14	: Répartition des patients en fonction de l'âge	70
Tableau. 15	: Répartition des cas selon la profession	72
Tableau. 16	: Répartition des cas selon l'activité physique	73
Tableau. 17	: Répartition des cas en fonction des bains chauds	73
Tableau. 18	: Répartition des cas en fonction de l'exposition professionnelle	74
Tableau. 19	: Répartition des cas en fonction du statut tabagique	74
Tableau. 20	: Répartition des fumeurs en fonction de la moyenne de cigarettes /jour	75
Tableau. 21	: Répartition des cas en fonction de la consommation d'alcool	75



Optimized using
trial version
www.balesio.com

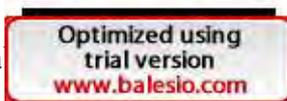
Tableau. 22 : Répartition des cas en fonction des habitudes de vie toxiques	76
Tableau. 23 : Répartition des cas en fonction des antécédents	76
Tableau. 24 : Infertilité et antécédents médicaux	77
Tableau. 25: Distribution des patients selon les antécédents urogénitaux	78
Tableau. 26 : Répartition des cas en fonction des antécédents familiaux	78
Tableau. 27 : Relation entre les tranches d'âge et le résultat du spermogramme.	81
Tableau. 28: Matrice de corrélation de pearson des Caractéristiques du sperme tout âge confondu	83
Tableau. 29: Matrice de corrélation de Pearson des Caractéristiques du sperme des patients dont l'âge est entre 26-30	84
Tableau. 30: Matrice de corrélation de Pearson des Caractéristiques du sperme dont l'âge est entre 31-35	84
Tableau. 31 : Matrice de corrélation de Pearson des Caractéristiques du sperme dont l'âge est entre 36-40	85
Tableau. 32: Matrice de corrélation de Pearson des Caractéristiques du sperme dont l'âge est entre 41-45	85
Tableau. 33: Matrice de corrélation de Pearson des Caractéristiques du sperme dont l'âge est de 46-50	86
Tableau. 34: Matrice de corrélation de Pearson des Caractéristiques du sperme dont l'âge est de 51-55 ans	86
Tableau. 35: Résultats de la comparaison entre les classes d'âge pour les différents paramètres	88
Ta  des caractéristiques du spermogramme selon les classes d'âge	89
Ta  on des valeurs moyennes des paramètres spermatiques des 7 Groupes	91

Tableau. 38 : Influence des bains chauds sur les différents paramètres spermatiques	92
Tableau. 39 : Influence de la consommation de la quantité du tabac sur les différents paramètres spermatiques	93
Tableau. 40 : Influence de la consommation du tabac et d'alcool sur les différents paramètres spermatiques	93
Tableau. 41: Répartition des cas en fonction de la numération	94
Tableau.42 : Répartition des cas en fonction de la mobilité	95
Tableau. 43 : Répartition des cas en fonction des formes typiques des spermatozoïdes	96
Tableau. 44 : Paramètres biologiques	97
Tableau. 45: Fréquence des embryons transférés	98
Tableau. 46: Répartition des cas en fonction des résultats positifs	99
Tableau. 47 : Les chances de grossesse par cycle de traitement en fonction du nombre des embryons transférés	99
Tableau. 48 : Les résultats d'ICSI en fonction du nombre d'embryons transférés	100
Tableau. 49 : Les chances de grossesses en fonction du nombre d'embryons transférés	100
Tableau. 50 : Répartition des cas en fonction des embryons transférés	101
Tableau. 51 : Tabac et résultats d'ICSI	101
Tableau. 52 : Caractéristiques des patients ayant la macrocéphalie	103
Tableau. 53: Caractéristique des patients ayant la globozoospermie	112



TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS ET DÉDICACES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION	1
I. GENERALITES	4
I.1. Définition	4
II. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES	4
 Chapitre. I : RAPPELS ANATOMIQUES, HISTOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DE L'APPAREIL GENITAL MALE	
I. RAPPEL ANATOMO-HISTOLOGIQUE DE L'APPAREIL GENITAL MALE	6
I.1. Les testicules	6
I.2. Les voies spermatiques	6
I.2.1. Les voies spermatiques intra-testiculaires	7
I.2.2. Les cônes efférents	7
I.2.3. L'épididyme	7
I.2.4. Le canal déférent	7
I.2.5. Le canal éjaculateur	8
I.3. Les glandes annexes	8
I.3.1. Les vésicules séminales	8
I.3.2. La prostate	8
I.3.3. Le préputer	8
II. ...	9
I. ...	10
II.1.1. ...	10
II.1.2. Contrôle de la sécrétion des gonadotrophines	11



III. Le sperme	11	
III. 1 Définition	11	
III. 2 Les différentes fractions du sperme	11	
III.3. Le liquide séminal	12	
IV. Influence de certains facteurs sur la spermatogenèse	12	
IV.1 Facteurs physiologiques	12	
IV.2 Facteurs physiques	12	
IV. 3 Facteurs pharmacologiques	12	
IV. 4 Facteurs exogènes	12	
V. Bilan clinique de l'infertilité masculine	13	
V.1. Interrogatoire	13	
V.2. Examen clinique	13	
VI. Bilan paraclinique de première intention	14	
VI.1. Spermogramme et spermocytogramme	14	
VI.2. Interprétation du spermogramme	14	
VI.3. Normes du spermogramme	15	
VI.4. Le spermocytogramme	17	
VI.4.1 Méthode de classification de David : Principe, définition et exemples	17	
VII. Causes d'infertilité masculine	24	
VII.1. Causes prétesticulaires	25	
VII.2. Causes testiculaires	25	
VII.3 Les troubles érectiles et éjaculatoires	26	
VII.4 L'obstruction des voies séminales	26	
VIII. Assistance médicale à la procréation (AMP)	26	
VIII.1 Insémination artificielle avec sperme du conjoint	26	
VIII.2 Fécondation in vitro (FIV)	27	
VIII.3 Technique de fécondation avec micromanipulation : injection intra-		
cyt	tozoïde (ICSI)	27
'	ie	27
ECTS GENETIQUES DE LA TERATOZOOSPERMIE		
L'i	veaux gènes impliqués dans des formes rares d'infertilité	
(Té		28
1.	Le syndrome des spermatozoïdes macrocéphales	28



1.1 Stratégie de localisation d'un gène pathogène par cartographie d'homozygotie.	29
2. La globozoospermie	31
3. Les anomalies qui touchent la pièce intermédiaire du spermatozoïde	33
3.1. Les spermatozoïdes sans tête (décapités, acéphaliques, pinheads) ou flagelles isolés	34

MATERIEL ET METHODES

Chapitre.1 : ETUDE CYTOLOGIQUE ET EPIDEMIOLOGIQUE DES INFERTILITES MASCULINES

Réalisation du protocole

Population cible	35
1. Les paramètres étudiés	35
1.1 Paramètres épidémiologiques	35
1.2. Les paramètres cliniques	36
1.3. Paramètres paracliniques	37
1.3.1. Le spermogramme et spermocytogramme	37
Technique d'ICSI	42

Chapitre. 2: DIAGNOSTIC GENETIQUE DES FORMES TRES RARES DE TERATOZOOSPERMIE SEVERE DANS UNE POPULATION DE L'EST ALGERIEN

Patients	46
Technique de PCR	51
Diagnostic de la globozoospermie Recherche délétions DPY19L2	58
Technique de PCR	58



RESULTATS ET DISCUSSION

De la fréquence des spermogrammes et spermocytogrammes pathologiques	63
Fréquence des spermogrammes et spermocytogrammes pathologiques	64

Sur le plan clinique	65
Sur le plan biologique	65
Répartition de type d'infertilité selon les pathologies	66
Répartition des cas en fonction du lieu d'habitat	68
Répartition des cas en fonction des différents facteurs de risque	69
Age	69
Relation entre le type d'infertilité et les tranches d'âge des patients.	69
Profession	71
L'activité physique	72
Les bains chauds	73
Répartition des cas selon l'exposition professionnelle	73
Les habitudes de vie toxiques	74
Statut tabagique des patients	74
Consommation d'alcool	75
Consommation de cigarette et d'alcool ensemble	75
Antécédents	76
Antécédents médicaux	76
Antécédents urogénitaux	77
Antécédents familiaux	78
Maladies transmissibles	79
Les facteurs de risque comportementaux et environnementaux et leur influence sur les maladies sexuellement transmissibles	79
Distorsions des spermatozoïdes selon l'âge	80
Evolution des paramètres spermatiques en fonction de l'âge	81



Optimized using
trial version
www.balesio.com

La liaison entre les caractéristiques du sperme et l'âge	82
Etude de la régression linéaire des caractéristiques du sperme en fonction de l'âge	82
L'étude de la dépendance entre la profession et les paramètres spermatiques	90
L'étude de la dépendance entre les bains chauds et les paramètres spermatiques	91
Influence de la consommation du tabac et d'alcool sur les différents paramètres spermatiques	92
Influence de la consommation de la cigarette sur les paramètres spermatiques	92
Répartition des cas en fonction des résultats des différents paramètres spermatiques	93
Répartition des cas en fonction du volume de l'éjaculat	94
Répartition des cas en fonction de la numération	94
Répartition des cas en fonction de la mobilité	95
Répartition des cas en fonction de la morphologie des spermatozoïdes	96
Résultats d'ICSI	97
Fréquence des embryons transférés	97
Répartition des cas pathologiques selon le résultat d'ICSI	98
Résultats positifs	98
Répartition des cas en fonction des embryons congelés	100
Résultats d'ICSI et consommation de la cigarette	101
Répartition des cas en fonction de la consommation de la cigarette	102
Les anomalies de la spermatogénèse	102
1. Les anomalies de la spermatogénèse	102
Les anomalies de la spermatogénèse	102
Analyse de la morphologie des spermatozoïdes	102



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Analyse génétique	106
Les patients atteints de globozoospermie	108
Caractéristiques spermatiques	109
Résultats d'analyse en MLPA	110
DISCUSSION	113
CONCLUSION	130
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	
RESUMES	
PUBLICATIONS	



INTRODUCTION



Optimized using
trial version
www.balesio.com

L'infertilité constitue de nos jours un réel problème de santé publique. Malgré les progrès récents dans le diagnostic précoce et la prise en charge des couples infertiles, la non procréation demeure la première cause de divorce en Algérie. Il est donc capital de conjuguer les efforts entre fondamentalistes et cliniciens pour proposer de nouvelles solutions thérapeutiques adaptées permettant de diminuer la souffrance de ces couples dans un pays où être stérile est une fatalité pour toute la famille. La situation d'infertilité interroge à la fois le processus de parentalisation et celui de filiation, pour devenir père, il faut pouvoir s'inscrire dans une filiation, se situer, à la suite de son père, l'ordre des générations est très important dans notre société. C'est par quoi un individu se relie à ses ascendants et ses descendants. La stérilité masculine est donc une atteinte de l'individu dans son pouvoir de reproduction.

L'infertilité est définie par l'absence de conception après 24 mois de rapports sexuels non protégés (Brzakowski et al., 2009). Elle touche 80 millions de personnes dans le monde et environ un couple sur six est confronté à une infertilité primaire ou secondaire (Le Goff et al., 2008). L'infertilité touche 15% des couples en France (Sharlip et al., 2002), en Algérie, on estime qu'environ 15% des couples en souffrent (Bouzekrini, 2012). On trouve une étiologie masculine dans environ deux tiers des couples, alors qu'auparavant on attribuait les problèmes de stérilité essentiellement à la femme (Sharlip et al., 2002).

L'altération de la qualité du sperme, observée depuis plusieurs décades, soulève le problème du déclin de la fertilité des hommes. En plus des variations physiologiques, génétiques et environnementales, le mode de vie (tabac, alcool, bains chauds) et les facteurs psychosociaux semblent affecter la production du sperme (Sharpe et Franks, 2002). Toutefois, les différentes études portant sur la relation entre ces facteurs et l'infertilité présentent des résultats contradictoires. De nouvelles études sont donc nécessaires pour une meilleure compréhension de l'effet de ces facteurs sur la physiopathologie spermatique ce qui justifie le choix de ce sujet. Lors du bilan de l'ir

Les dar al.,



Le spermogramme et le spermocytogramme restent les examens clés. Les anomalies masculines sont variées et souvent multifactorielles, se traduisant par une anomalie quantitative et/ou qualitative du sperme (Schlossera et al., 2002). La physiopathologie du sperme revêt une grande importance dans l'exploration de l'infertilité masculine tant sur le plan diagnostique en guidant la recherche

étiologique mais également sur le plan thérapeutique en jouant un rôle significatif dans le conditionnement des résultats de la fécondation assistée, confortant ainsi encore plus la place occupée par l'infertilité masculine liée aux anomalies morphologiques des spermatozoïdes dans l'étude de la reproduction humaine et des difficultés qu'elle rencontre.

L'existence d'anomalies chromosomiques et de cas familiaux montrent qu'un défaut génétique peut être à l'origine de certaines infertilités. Seuls les résultats concernant les anomalies du caryotype représentent les données les plus anciennes portant sur les rapports entre les anomalies génétiques et l'infertilité masculine (Vialard et Boudjenah, 2010). Une proportion importante des cas de stérilité masculine est causée par des défauts génétiques. Depuis la découverte des microdélétions sur le chromosome Y dans les années 1970 (Tiepolo et Zuffardi, 1976), Seuls quelques gènes pourraient être formellement impliqués dans des anomalies de la spermatogénèse. Les deux principaux gènes corrélés avec des défauts de sperme sont AURKC (Aurora kinase C) (Dieterich et al., 2007) et DPY19L2 (Harbuz et al. 2011) qui présentent des mutations dans un grand nombre d'individus non apparentés ayant le syndrome des spermatozoïdes macrocéphales et la globozoospermie.

Actuellement, plus de 60 % des indications d'AMP sont liées à l'homme : en effet, de nombreuses études montrent une diminution de la qualité du sperme (Jørgensen et al., 2001). Ce qui justifie le choix de ce sujet, où à travers une étude épidémiologique et cytologique basée sur un bilan d'analyses cytospermiologiques et sachant que les facteurs étiologiques masculins sont multiples, nous avons tenté de :

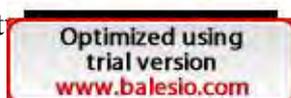
- Cerner les facteurs de risque comportementaux et environnementaux affaiblissant les paramètres spermatiques.

- Evaluer sa vraie place dans l'infertilité du couple.

- Déterminer la fréquence des différentes anomalies du spermogramme et

- Cerner la place de la fécondation et évaluer le retentissement de la technique d'ICSI sur

cet



Dans le deuxième volet une étude génétique est abordée, elle a pour but de:

- Décrire les étiologies du syndrome des spermatozoïdes macrocéphales et la globozoospermie et établir ses phénotypes.
- Souligner les risques d'infertilité et d'échec des techniques de PMA liés à la présence de ces spermatozoïdes macrocéphales et globocéphales.
- Réaliser l'exploration moléculaire d'une forme rare d'infertilité masculine liée à une tératozoospermie monomorphe (macrocéphalie) en déterminant une mutation nouvellement décrite au niveau du gène AURORA KINASE C.
- Réaliser l'exploration moléculaire d'une deuxième forme rare d'infertilité masculine liée à une tératozoospermie monomorphe (globozoospermie) en déterminant la délétion complète du gène DPY19L2.
- Déterminer la fréquence des 2 mutations causant ces deux phénotypes dans la population de l'Est Algérien en déterminant le pourcentage des mutations C.144delC (-/+), c.144del (+/+), p.Y248 * et DPY19L2.
- Appliquer la technique de séquençage et MLPA afin d'identifier d'éventuelles mutations au niveau du gène AURKC et la délétion du gène DPY19L2 respectivement.

L'identification de gènes responsables, leurs variations (Mutations et polymorphismes) ainsi que les phénotypes associés représentent une étape importante dans la prévention, le diagnostic et le traitement des maladies. La macrocéphalie et la globozoospermie sont encore de rares formes récurrentes de tératozoospermie retrouvées fréquemment chez les sujets originaires d'Afrique du Nord. Jusqu'à présent, aucune étude n'a évalué la fréquence de ces phénotypes et leur étiologie dans la population Algérienne d'où l'intérêt et l'originalité de ce travail. Nous rapportons ici la première analyse génétique des hommes Algériens de tératozoospermie avec un accent particulier sur les hommes avec globozoospermie en déterminant les mutations nouvellement décrites de ces phénotypes, leur fréquence dans une population de l'Est Algérien en PMA.



PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE



Optimized using
trial version
www.balesio.com

I. GENERALITE

I.1. Définition

Le terme d'infertilité est préférable à celui de stérilité, ce dernier signifie qu'aucune thérapeutique curative n'est possible (Chanson et al., 2000).

Cependant cette notion stricte et définitive de stérilité a changé depuis la possibilité des recueils de spermatozoïdes intratesticulaires et intraépididymaires (Hammamah et al., 1999).

L'infertilité masculine est l'impossibilité pour un homme d'assurer une procréation du fait d'une défaillance des paramètres spermatiques, ce qui établit de façon significative la différence biologique entre population fertile et infertile (Pontonnier et Bujan, 1993).

On décrit deux types d'infertilité masculine :

- L'infertilité primaire ou l'homme n'a jamais été responsable d'une grossesse.
- L'infertilité secondaire ou l'homme a été responsable d'une grossesse qu'elle qu'en été l'issue, avec la partenaire présente ou une autre.

II. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

L'indicateur le plus fréquemment utilisé pour mesure d'infertilité est la fécondabilité ou probabilité mensuelle de conception (Hammamah et al., 1999). Elle est considérée comme constante pour un couple donné sur une certaine période, mais différente d'un couple à l'autre.

Au temps 0 de désir de grossesse, la moyenne de fécondabilité des couples est estimée à 25%, c'est-à-dire que les couples ont en moyenne 25% de chance de procréer par cycle. La fécondabilité fait intervenir un facteur temps essentiel à prendre en compte pour la prise en charge du couple. En effet les couples les plus fertiles obtiendront rapidement la grossesse et disparaîtront de la cohorte de départ. Au fur et à mesure des années, la proportion des couples infertiles deviendra de plus en plus importante avec une fécondabilité moyenne est de 12% : après 2 ans elle n'est plus que de 7.9 % (Hammamah et al., 1999).

l'infertilité correspond au nombre de couples infertiles répertoriés à un âge donné divisé par le nombre total de couples en âge de procréer.



SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La prévalence correspond au nombre de cas apparus en une année rapporté au nombre total de couple en âge de procréer.

L'infertilité constitue un motif de consultation de plus en plus fréquent dans les pays industrialisés. L'âge moyen de la maternité est en constante augmentation, reflet et conséquence des changements sociologiques en rapport avec les progrès de la contraception, les études et carrières féminines, les secondes unions et désormais le désir des couples de profiter de la vie à deux avant de s'engager dans la voie familiale.

Deux enquêtes françaises servent de référence, la première réalisée en 1978 par Leridon estimait à 15 % la proportion des couples ayant des difficultés à concevoir et à 4% la proportion de femmes stériles, correspondant à une fécondabilité moyenne de 10 % (Hammamah et al., 1999). La deuxième, plus récente, il s'agit d'une étude multicentrique de Thonneau et al (Thonneau et al., 1991), menée dans trois départements français (Indre-et-Loire, Loire-Atlantique et Haute-Vienne) de juillet 1988 à juin 1989, sur 1686 couples ayant consulté pour une infertilité primaire ou secondaire de plus d'une année, estime la prévalence de l'infertilité à 14.1 % et conclut que 1 femme sur 7 consulterait pour infertilité au cours de sa vie reproductive, et qu'en termes de soins de santé, environ 60 000 femmes consulteraient par an.



Chapitre I :
RAPPELS ANATOMIQUES,
HISTOLOGIQUES ET
PHYSIOLOGIQUES DE L'APPAREIL
GENITAL MALE



Optimized using
trial version
www.balesio.com

GENITAL MALE :

La fonction génitale de l'homme est d'élaborer des gamètes mâles appelés spermatozoïdes, et de les introduire dans les voies génitales de la femme.

L'appareil génital mâle est à cet effet constitué par un ensemble d'organes et de structures participant à la formation, la maturation et l'émission sous pression des différents constituants du sperme. Ces organes et structures sont les testicules, les voies spermatiques notamment l'épididyme, le canal déférent et l'urètre, les glandes annexes constituées par la prostate, les vésicules séminales et les glandes bulbo-urétrales ou glandes de Cowper (fig.1).

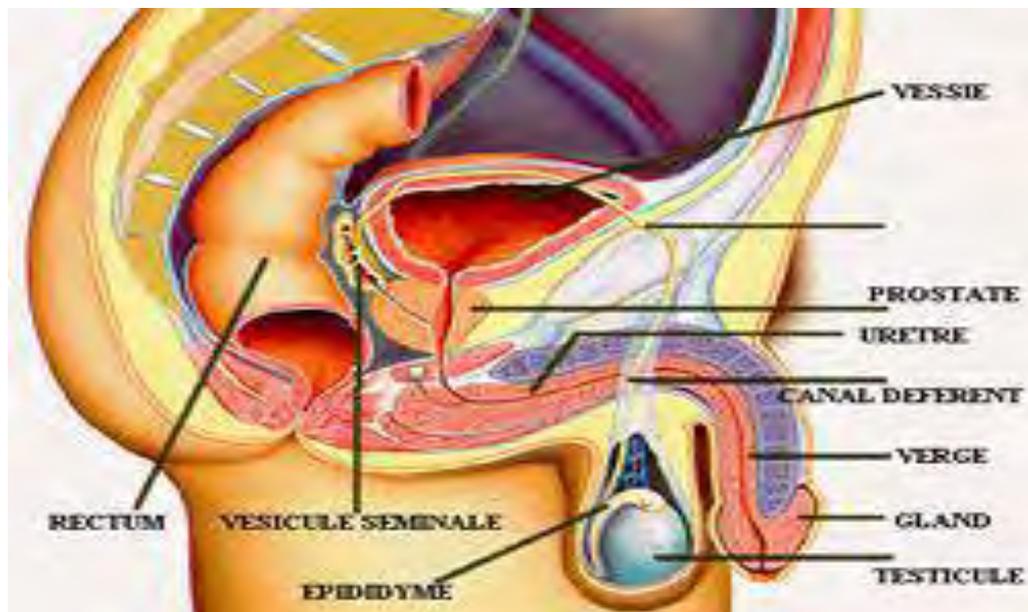


Figure. 1 : L'appareil génital masculin (coupe sagittale) (Vacheret, 2005).

I.1. Les testicules :

Les testicules ou gonades mâles sont des organes pairs, normalement placés au-dessous de la verge, dans les bourses. Chaque testicule a la forme d'un ovoïde aplati

tra
Il r
ha

grand axe est oblique de haut en bas et d'avant en arrière (fig. 1).
res de longueur, 2,5 centimètres d'épaisseur et 3 centimètres de
ne 20 grammes (Rouvière et Delmas, 1992).



Optimized using
trial version
www.balesio.com

anatomiques

les élaborés dans les tubes séminifères vont être évacués grâce à
un système de canaux constituant les voies excrétoires du sperme. A ces conduits, sont

annexés des glandes dont les produits de sécrétion participent à la constitution du sperme. On donne le nom de tractus génital male à l'ensemble des voies excrétrices et des glandes annexes. On distingue 2 catégories de voies spermatiques ; les uns sont intra-testiculaires, les autres extra-testiculaires

I.2.1. Les voies spermatiques intra-testiculaires

Ce sont les tubes droits et le réte testis. Les tubes droits sont des conduits de 1mm de long, tapissés histologiquement d'un épithélium simple cubique ou aplati. Le réte testis appelé aussi réseau de Haller constitue davantage des lacunes que des canaux creusés dans le corps d'Highmore. Il est recouvert d'un épithélium cubique simple.

Ces 2 voies apparaissent comme des voies excrétrices du sperme. Les spermatozoïdes observés à ces niveaux ne sont pas doués de mouvements propres.

D'un point de vue médical, il peut exister de façon congénitale ou se produire de façon secondaire, une oblitération de ces voies étroites : il s'ensuit une azoospermie excrétrice qui peut être localisée seulement à un territoire du testicule.

I.2.2. Les cônes efférents

Ils appartiennent à l'épididyme dont ils constituent le globus major, tapissés histologiquement d'un épithélium festonné reposant sur une membrane basale.

I.2.3. L'épididyme

Il est placé sur le testicule à la manière d'un cimier de casque. Il décrit une courbe concave vers le bas, adaptée à la convexité du testicule. C'est un organe androgéno-dépendant qui concentre le sperme et permet aux spermatozoïdes d'acquérir leur mobilité et leur pouvoir fécondant (Staerman F, Hermabessiere J. 1993a). On lui décrit trois parties :

- ✓ une partie antérieure renflée, *la tête* ;
- ✓ une partie moyenne, *le corps* ;
- ✓ une extrémité postérieure, *la queue*.

I.2.4. Le canal déférent

spe
que
ver
alle
d'abouchement des vésicules séminales dans le canal déférent.

Optimized using trial version
www.balesio.com

suite au canal épидидymaire : c'est un élément du cordon environ 40cm de long pour un diamètre de 2mm. Partant de la traverse le canal inguinal et la fosse iliaque, puis il se recourbe u il se continue par le canal éjaculateur, il présente une dilatation canal déférent ou ampoule différentielle située au-dessus du point

Le canal déférent n'est pas une simple voie vectrice du sperme ; la présence de cellules de type glandulaire le rapproche du canal épидидymaire ; il est parcouru d'ondes péristaltiques qui assurent la progression des sécrétions testiculo-épididymaires.

Quant à l'ampoule du canal déférent, elle apparaît comme un réservoir à l'intérieur duquel s'accumule le sperme dans l'intervalle des éjaculations.

I.2.5. Le canal éjaculateur

Long de 2cm sur 1 mm de diamètre, il s'étend du point d'abouchement de la vésicule séminale dans le canal déférent à l'urètre prostatique ; son calibre diminue progressivement de son origine à sa terminaison. C'est un simple conduit vecteur (Langman, 1984).

I.3. Les glandes annexes :

Trois glandes sont annexées aux voies excrétrices masculines : les deux vésicules séminales (droite et gauche), la prostate et les deux glandes bulbourétrales ou glandes de Cowper. Ces glandes produisent la majeure partie du sperme.

I.3.1. Les vésicules séminales :

Ce sont deux réservoirs membraneux dans lesquels s'accumule le sperme dans l'intervalle des éjaculations. Chacune d'elles est branchée sur l'extrémité terminale de l'un des canaux déférents et s'étend en dehors de lui, entre la vessie et le rectum, suivant une direction oblique en dehors, en arrière et un peu en haut. Elles sont longues de 5 à 7 centimètres, de la forme d'un petit doigt.

Les vésicules séminales sécrètent un liquide clair, visqueux et alcalin, qui agit sur l'état physiologique des spermatozoïdes en maintenant normale leur mobilité et en leur assurant une vitalité maximale dans le sperme (Valeri et al., 1998).

I.3.2. La prostate

Elle apparaît comme un organe musculo-glandulaire, impaire et médian, adhérant à la face inférieure de la vessie et entourant le carrefour urogénital à l'abouchement des vésicules séminales et des canaux déférents.

Glandes de Cowper

appelées glandes de MERY-COWPER. Elles sont constituées de glandes de la taille de petites noisettes situées à la jonction de l'urètre et de l'aponévrose péniennne moyenne.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Elles possèdent un canal excréteur relativement long chez l'homme adulte, qui atteint 30 à 40 mm de long et il s'ouvre sur la paroi postérieure de l'urètre pénien au niveau de la partie antérieure du cul-de-sac du bulbe (Langman, 1984).

II. La spermatogénèse

La spermatogénèse est le processus de transformation de cellules souches appelées spermatogonies en gamètes males ou spermatozoïdes.

- **la spermatogénèse** : elle comporte plusieurs phases (fig. 2) :
- ❖ **La phase de multiplication** où une spermatogonie se divise en deux cellules toujours diploïdes ($2n$ chromosomes) appelées *spermatocytes de 1er ordre (I)*.
- ❖ **la phase d'accroissement** : ces spermatocytes de 1er ordre (I) deviennent plus volumineux avec des transformations de la chromatine. Ceci correspond à la prophase de la première division de méiose.
- ❖ **la phase de maturation** : le spermatocyte I se divise en deux *spermatocytes de 2ième ordre (II)* qui sont haploïdes (n chromosomes) par une mitose réductionnelle. Enfin, le spermatocyte II se transforme en spermatide qui ne se divisera plus.

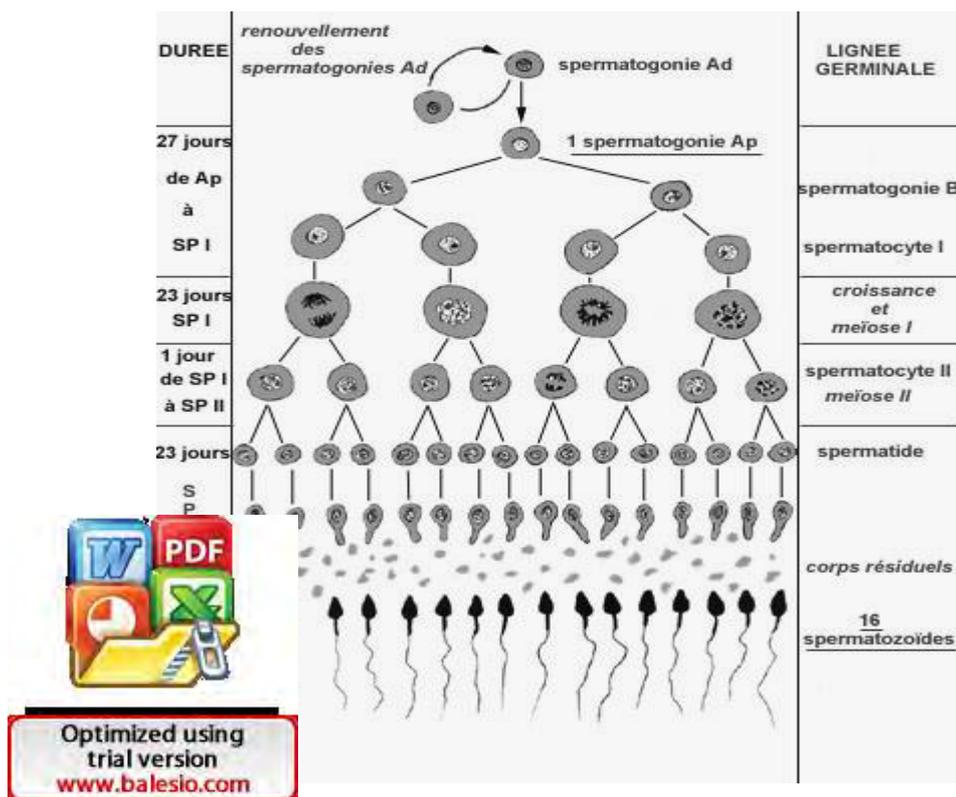


Figure. 2 : La spermatogénèse (Vacheret, 2005).

- **La spermiogenèse** (fig. 2 et 3) : c'est la dernière phase de différenciation ; étape capitale pendant laquelle le spermatide se transforme en spermatozoïde définitif, c'est-à-dire il perd son cytoplasme superflu et est doté d'une queue. Les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité ainsi que leur pouvoir fécondant au cours de la traversée de l'épididyme et du canal déférent. Ce pouvoir fécondant n'est d'ailleurs complet qu'après le parcours des voies génitales féminines (capacitation).

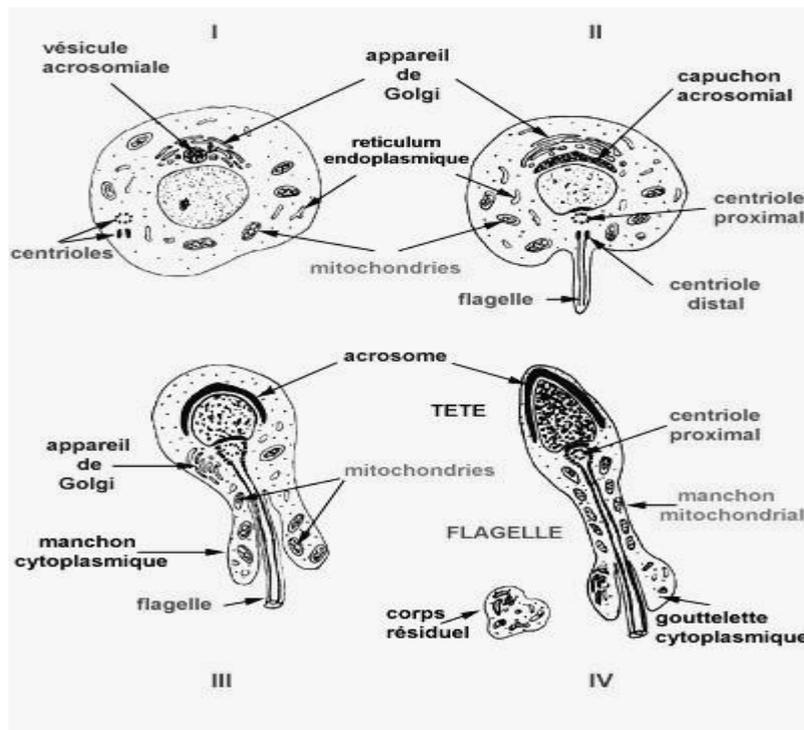


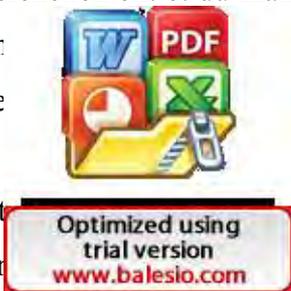
Figure. 3: Spermiogenèse (Vacheret, 2005).

II.1 Régulation hormonale de la spermatogenèse

L'installation de la spermatogenèse à la puberté et son maintien dépendent d'un contrôle hormonal hypothalamo-hypophysaire.

II.1.1 Action des gonadotrophines

La FSH en est l'hormone hypophysaire essentielle. Elle est responsable du déclenchement et du maintien de la spermatogenèse. Elle agit sur les tubes séminifères par l'intermédiaire des cellules de Sertoli pour assurer le bon déroulement de la spermatogenèse, agit aussi directement sur les multiplications goniales. Elle joue un rôle indirect. Elle agit sur les cellules de Leydig qui produisent la testostérone. En synergie avec la FSH, entraîne la production par la cellule de Sertoli de la protéine de liaison appelée ABP (Androgen Binding Protein). La liaison de



l'ABP aux androgènes permet le maintien d'une concentration élevée d'androgènes dans le tube séminifère, nécessaire à la poursuite de la méiose et de la spermiogénèse.

II.1.2 Contrôle de la sécrétion des gonadotrophines

Ce contrôle résulte de mécanismes complexes encore mal élucidés. Le contrôle principal est assuré par une neuro-hormone, la LH-RH ou Gn-RH (Releasing-Hormone) d'origine hypothalamique de sécrétion pulsatile et de demi-vie courte (4 minutes).

La sécrétion de la LH est contrôlée par le taux de testostérone et de dihydrotestostérone. La testostérone agit au niveau central en diminuant la fréquence des pulsations sécrétoires de LHRH (feed back négatif). Elle exerce également un effet inhibiteur au niveau hypophysaire. En ce qui concerne la FSH, c'est une hormone d'origine tubulaire appelée « inhibine » qui est responsable de feed back négatif entre FSH et activité spermatogénétique (Coulibaly et Oumar, 2000 ; Peter, 1991).

III. Le sperme

III. 1. Définition

Le sperme résulte du mélange lors de l'éjaculation de différentes sécrétions du testicule, du tractus génital et des glandes annexes. Il comprend :

- Une phase cellulaire : les spermatozoïdes.
- Une phase liquidienne : le plasma séminal.

III.2 Les différentes fractions du sperme

Lors de l'examen, le sperme est projeté par saccades et il a été ainsi démontré qu'il existe un fractionnement de l'éjaculat. Celui-ci comprendrait :

- Une fraction pré-spermatique (5 à 20 % du volume total) ; le liquide est très fluide et comprend les sécrétions mélangées des glandes de Cowper et des glandes urétrales. Elle peut contenir jusqu'à 5 % des spermatozoïdes.

- Une fraction spermatique (30 à 50 % du volume total) ; c'est la fraction principale de l'éjaculat. Elle contient la grande majorité des spermatozoïdes (46 à 80 %). Les sécrétions comprennent celles du canal déférent, de la prostate, des testicules et en partie des glandes annexes.

- Une fraction post-spermatique (13 à 32 % du volume total) ; elle renfermerait les sécrétions des glandes annexes. Elle peut aussi contenir les spermatozoïdes dont un fort pourcentage serait mort ou altéré. Toutefois, il est nécessaire de recueillir l'éjaculat total pour un bon examen du sperme (Mbacker, 1984).



Optimized using
trial version
www.balesio.com

III.3. Le liquide séminal

Il constitue la fraction liquidienne du sperme, très hétérogène. Il contient de nombreux constituants organiques, inorganiques et de multiples enzymes. Ces différents éléments proviennent des sécrétions des cellules glandulaires du tractus génital mâle. Le liquide séminal est obtenu par centrifugation du sperme ; il comprend les 9/10 èmes de l'éjaculat. Il reflète donc les sécrétions de l'ensemble des sécrétions des glandes accessoires et de tout l'épithélium glandulaire qui tapisse le tractus génital masculin : prostate, vésicules séminales, glandes de Cowper, ampoule du déférent, épидидyme, et autres glandes situées le long de la paroi du canal urétral et des voies génitales.

IV. Influence de certains facteurs sur la spermatogenèse

IV.1 Facteurs physiologiques

- Nutrition : le déroulement de la spermatogenèse humaine nécessite un rapport quantitatif et qualitatif convenable de protéines notamment certains acides aminés dont l'arginine, les acides gras et les vitamines (A, C, E par exemple).

- Vascularisation testiculaire : le testicule est vascularisé par l'artère testiculaire ; il est très sensible à l'ischémie (Coulibaly et Oumar 2000), (Alexandre, 1981), (Bakonde, 1983).

IV.2 Facteurs physiques

- Température : le testicule est très sensible aux variations de température. L'exposition de l'individu à de fortes chaleurs entraîne une oligospermie obtenue par des hyperthermies thérapeutiques (Afoutou, 1984).

- Radiations et spermatogenèse : on connaît très bien le rôle néfaste qu'entraîne l'irradiation testiculaire par certaines doses de rayons X ou de rayonnements gamma. Les lésions possibles peuvent aller depuis la destruction des spermatogonies jusqu'à l'apparition d'aberrations chromosomiques (Bakonde, 1983).

- 
- rmacologiques
- le
 - ce nitrofurantoïne, gentamicine
 - le
 - alcool, tabac, drogue.
- Optimized using trial version
www.balesio.com

IV. 4 Facteurs exogènes

Il s'agit du stress et des conflits socio-professionnels (Fernandez et Ville, 1989).

V. Bilan clinique de l'infertilité masculine

Les explorations pour infertilité sont proposées rapidement s'il existe des antécédents ou des facteurs de risque chez l'un des deux partenaires, en tenant compte également de leur anxiété et de leur âge au moment de la prise en charge. Dans l'idéal, le bilan clinique des deux conjoints permet d'orienter les examens complémentaires. Au final, tout avis pronostique et toute décision thérapeutique chez l'homme infertile ne peuvent être formulés qu'à la fin des investigations du couple (Schlosser et al., 2006).

V.1. Interrogatoire

L'interrogatoire doit être méthodique, éventuellement structuré par l'utilisation d'un questionnaire-type, pour identifier tous les facteurs potentiels d'infertilité. Il précise tout d'abord la nature de l'infertilité : primaire ou secondaire en cas de paternité antérieure, sa durée, l'âge de la partenaire et les résultats des explorations et traitements déjà réalisés. Les conditions et la qualité de la sexualité du couple doivent également être étudiées : contexte psychologique et social, fréquence des rapports sexuels au moment de l'ovulation, présence ou non de troubles érectiles et/ou éjaculatoires, utilisation de lubrifiants potentiellement toxiques pour les spermatozoïdes (Schlosser et al., 2006).

Les antécédents familiaux d'infertilité, de fausses couches spontanées à répétition ou d'anomalies chromosomiques, les antécédents médicaux et chirurgicaux personnels peuvent orienter vers une cause congénitale ou génétique. Les prises médicamenteuses passées et actuelles peuvent modifier la libido, l'éjaculation et la spermatogenèse de manière plus ou moins définitive. Enfin, certaines expositions professionnelles ou toxiques environnementales (tabagisme, intoxication éthylique chronique, cocaïne, marijuana, etc.) sont à risque pour la fertilité masculine.

V.2. Examen clinique

- Recherche des signes de carence androgénique et de dysfonction gynécologique (obésité, raréfaction de la pilosité pubienne et...), ainsi que les cicatrices chirurgicales abdominales et

- L'examen doit être général mais une attention particulière doit être donnée à l'examen des organes génitaux :



Optimized using
trial version
www.balesio.com

- L'examen du pénis : recherche un hypospadias très postérieur rendant l'éjaculation inefficace...
- La palpation des testicules et la mesure de leur taille : le volume de la glande testiculaire est lié à la spermatogénèse (Jockenhovel, 2004).
Ce volume peut être évalué à l'aide d'un orchimètre ou d'un pied à coulisse.
Le testicule est hypotrophique si son volume est compris entre 6 et 15 ml et atrophique en deçà de 6 ml.
L'atrophie testiculaire permet de poser le diagnostic de l'infertilité sécrétoire (absence de production des spermatozoïdes). Cet examen permet parfois de découvrir un cancer testiculaire, une ectopie...
- La présence et la palpation des canaux déférents : à la recherche de signes obstructifs de la voie séminale. En effet, l'absence des déférents évoque une agénésie congénitale bilatérale des déférents (ACBD) alors que la présence de nodules avec une consistance dure des déférents évoque une cause infectieuse (tuberculose génitale....).
- La recherche de varicocèle, hydrocèle.
- Le toucher rectal est fortement recommandé : état de la prostate et des vésicules séminales.

VI. Bilan paraclinique de première intention

VI.1. Spermogramme et spermocytogramme

Le spermogramme est un élément incontournable de l'évaluation de la fertilité masculine. Le recueil du sperme doit être réalisé au laboratoire, par masturbation, après un délai de 2 à 5 jours d'abstinence. Des valeurs de référence ont été définies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Rowe et al., 2000 ; Staerman et Hermabessiere, 1993).

VI.2. Interprétation du spermogramme

• Le volume

- Un fonctionnement du système glandulaire :
un volume (hypospermie) < 2 ml peut traduire un hypogonadisme, une hypospermie basse ou une agénésie vésiculaire. En outre, une prostatite ou une infection des vésicules séminales peuvent faire varier le volume séminal.
- Un volume (hyperspermie) > 6 ml peut traduire une infection ou une éjaculation incomplète (éjaculation rétrograde).

• Le pH



Optimized using
trial version
www.balesio.com

L'éjaculat est un mélange de sécrétions prostatiques acides (blanchâtres) et de sécrétions vésiculaires basiques (jaunâtres).

- Un pH acide $< 7,2$ traduit une insuffisance ou une absence de sécrétions vésiculaires (exemple : agénésie des vésicules séminales).
- Un pH basique $> 7,8$ évoque une insuffisance prostatique (prostatite chronique).

• **La numération des spermatozoïdes**

Il est difficile, voire impossible, de définir une valeur au dessous de laquelle tous les hommes sont infertiles.

- Absence totale de spermatozoïdes ou azoospermie (0 / ml) qui peut être d'origine obstructive (obstruction des voies séminales) ou non obstructive (absence de production par les testicules).
- Spermatozoïdes < 20 millions par ml ou oligospermie ou oligozoospermie.

Le seuil de fécondité est de 5 millions par ml. Entre 5 et 20 millions par ml, le pourcentage de grossesse est relativement identique mais le temps d'attente est plus long.

• **La mobilité**

On parle d'asthénospermie ou asthénozoospermie en cas de diminution de la mobilité des spermatozoïdes par rapport aux valeurs normales. En cas d'asthénospermie, il faut chercher une infection, la présence d'anticorps anti spermatozoïdes, une varicocèle...

• **La vitalité**

On parle de nécrospermie si le taux de spermatozoïdes morts est élevé (spermatozoïdes vivants $< 60\%$).

• **La morphologie**

Un sperme normal contient plus de 30 % de spermatozoïdes normaux. L'identification, le dénombrement des différentes anomalies et le nombre de spermatozoïdes (SPZ) anormaux (qui doivent figurer sur le spermocytogramme), permettent de calculer l'index d'anomalies multiples (IAM).

La



laisser significativement quand l'IAM $> 1,6$.

• **Spermogramme**

des valeurs normales selon l'OMS.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau. 1 : Valeurs normales des paramètres du spermogramme.

Valeurs normales selon l’OMS-2010		Définitions de l'anomalie	
Volume du sperme : > 1,5 ml (1,4 - 1,7)		< 1,5 ml : Hypospermie > 6 ml : Hyperspermie	
Numération des spermatozoïdes (par ml): ≥ 15 millions/ml (12 - 16) Numération des spermatozoïdes (par éjaculat): > 39 millions (33 - 46)		0 : Azoospermie ≤ 15 millions/ml : Oligozoospermie	
Mobilité des spermatozoïdes à la première heure après l'éjaculation. - Grade (a) : mobilité en trajet fléchant rapide (>25 $\mu\text{m/s}$) - Grade (b) : mobilité lente et progressive (5-25 $\mu\text{m/s}$). - Grade (c) : mobilité sur place. - Grade (d) = immobile	- Mobilité progressive de type (a+b) des spermatozoïdes : $\geq 32\%$ (31 à 34) (ou $\geq 30\%$)	<32%	Asthénospermie
	- Mobilité de type (a+b+c) des spermatozoïdes : $\geq 40\%$ (38 - 42)	< 40 %	
Mobilité à la que apr 	Chute de mobilité inférieure à 50 % comparativement aux chiffres de la première heure	Chute de mobilité supérieure à 50%	
Mc  \geq	spermatozoïdes : >30 % (3,0 - 4,0)	< 4 %: Tératospermie	

(se rapproche de la classification Kruger) Ou : $\geq 15\%$ (selon la classification de David modifiée par Auger et Eustache).	
Leucocytes < 1 million/ml	> 1 million/ml : Leucospermie
Vitalité des spermatozoïdes : $\geq 58\%$ (55 - 63)	<58 %: <u>Nécrospermie</u>
<ul style="list-style-type: none"> • D'autres valeurs normales (consensus) : ○ pH : $\geq 7,2$ ○ MAR test (anticorps anti spermatozoïdes de type IgA, IgG, IgM fixés sur les spermatozoïdes) : < 50 %. ○ Immunobead test (motile spermatozoa with bound particules) (ou spermatozoïde mobile avec anticorps antispermatozoïde) : < 50 % ○ Peroxidase-positive leukocytes : < (1,0) (million/ml). ○ Fructose séminal : $\geq (13) \mu\text{mol/éjaculat}$ ○ Phosphatase acide seminale : $\geq 200 \text{ U/éjaculat}$. ○ Acide citrique séminal : $\geq 52 \mu\text{mol/éjaculat}$. ○ Zinc séminal : $\geq (2,4) \mu\text{mol/éjaculat}$ ○ Seminal neutral glucosidase : $\geq (20) \text{ mU/éjaculat}$ ○ L-carnitine séminale : 0.8-2.9 $\mu\text{mol/éjaculat}$ 	

VI.4. Le spermocytogramme

Définition

C'est l'étude morphologique ou cytologique des spermatozoïdes. Il permet parfois de poser le diagnostic étiologique. Actuellement, la coloration Hemalun-Shorr qui associe un colorant nucléaire, **l'hemalun de Mayer** à un colorant cytoplasmique, **le colorant de Shorr** permet l'étude morphologique des spermatozoïdes.



Optimized using trial version www.balesio.com

classification de David : Principe, définition et exemples

Principe

La classification de David pour le classement des anomalies morphologiques des spermatozoïdes a été proposée en 1972 lors d'un colloque sur la fécondité et la stérilité du male et publiée en 1975 (Fellous et Siffroi, 2003). La classification initiale

comportait 13 types d'anomalies, sept pour la tête et six pour le flagelle. La classification de David modifiée recense en dehors des spermatozoïdes morphologiquement normaux :

_ **7 anomalies de la tête** : têtes allongées, amincies, microcéphales, macrocéphales, multiples, présentant un acrosome anormal ou absent, présentant une base (région postacrosomique) anormale.

_ **3 anomalies de la pièce intermédiaire (PI)** :

reste cytoplasmique, PI grêle, PI angulée.

_ **5 anomalies de la pièce principale** : absente, écourtée, de calibre irrégulier, enroulée et Multiple.

Compte tenu de l'inhomogénéité du sperme humain et de la faible fréquence de certaines anomalies, 100 spermatozoïdes au minimum doivent être classés pour fournir une évaluation correcte du pourcentage de spermatozoïdes typiques et du profil des différentes atypies. Cette recommandation est cependant parfois impossible à suivre lorsque la concentration de spermatozoïdes est très faible. Dans ces cas, la classification peut être faite à partir de 50 spermatozoïdes, mais le résultat pour les spermatozoïdes normaux et anormaux ne doit pas être rendu en pourcentage et la conclusion doit tenir compte de la fiabilité diminuée des fréquences des anomalies retrouvées, notamment lorsqu'il s'agit d'anomalies rares.

Les flagelles isolés ou les spermatozoïdes en lyse ne sont pas classés dans la grille de lecture modifiée, mais leur fréquence est évaluée parallèlement au compte des spermatozoïdes normaux et anormaux. Il en est de même pour la fréquence des cellules de la lignée blanche, des autres cellules (cellules du tractus urogénital) et des fragments cellulaires.



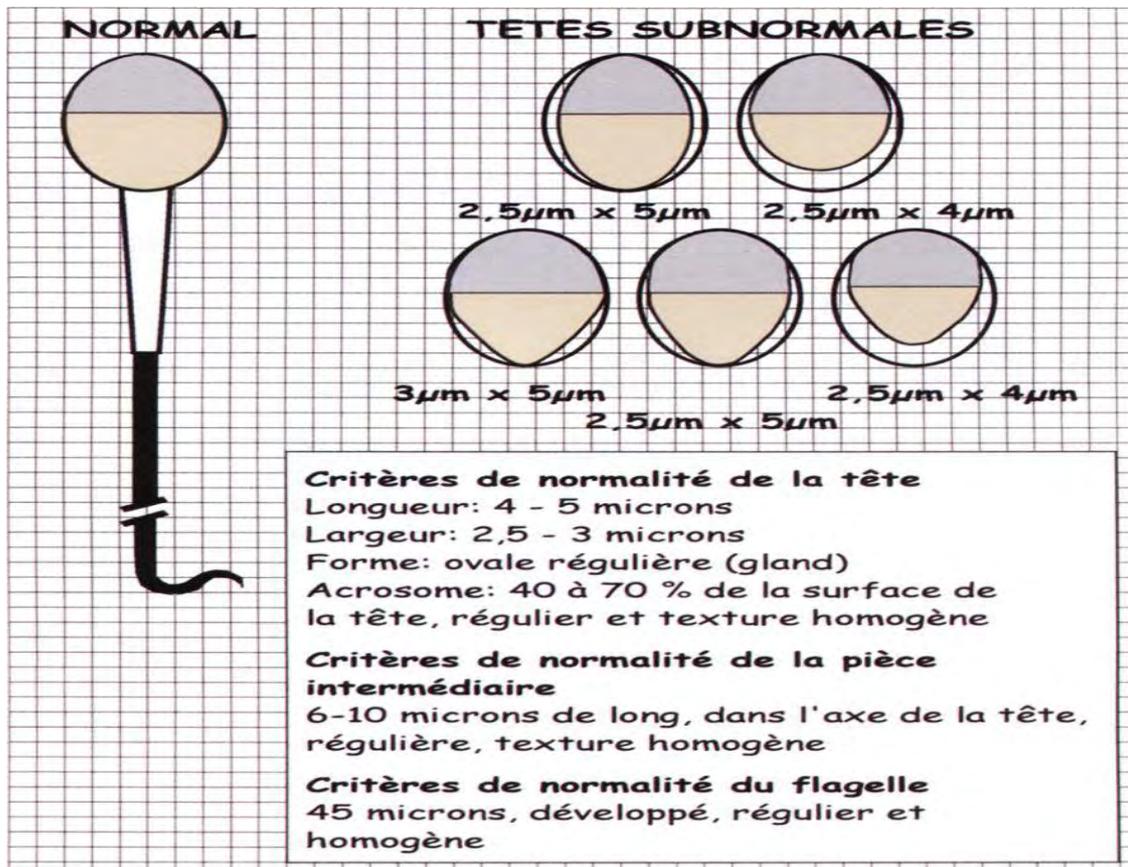


Figure. 4 : Illustrations du spermatozoïde humain normal ou subnormal, considéré comme normal, et rappel des définitions.

Tête allongée: Le grand axe est plus long que la normale et le petit axe présente une longueur normale.

Tête amincie: Le petit axe a une longueur plus petite que la normale et le grand axe présente une longueur normale.

Microcéphale: Le grand axe et le petit axe ont des longueurs plus petites que la normale.

Dans cette catégorie entrent les têtes rondes le plus souvent dépourvues d'un acrosome, mais il existe d'autres aspects de spermatozoïdes microcéphales avec un acrosome plus ou moins normal.

Macrocéphale: Le grand axe et le petit axe sont plus grands que la normale (fig. 5).



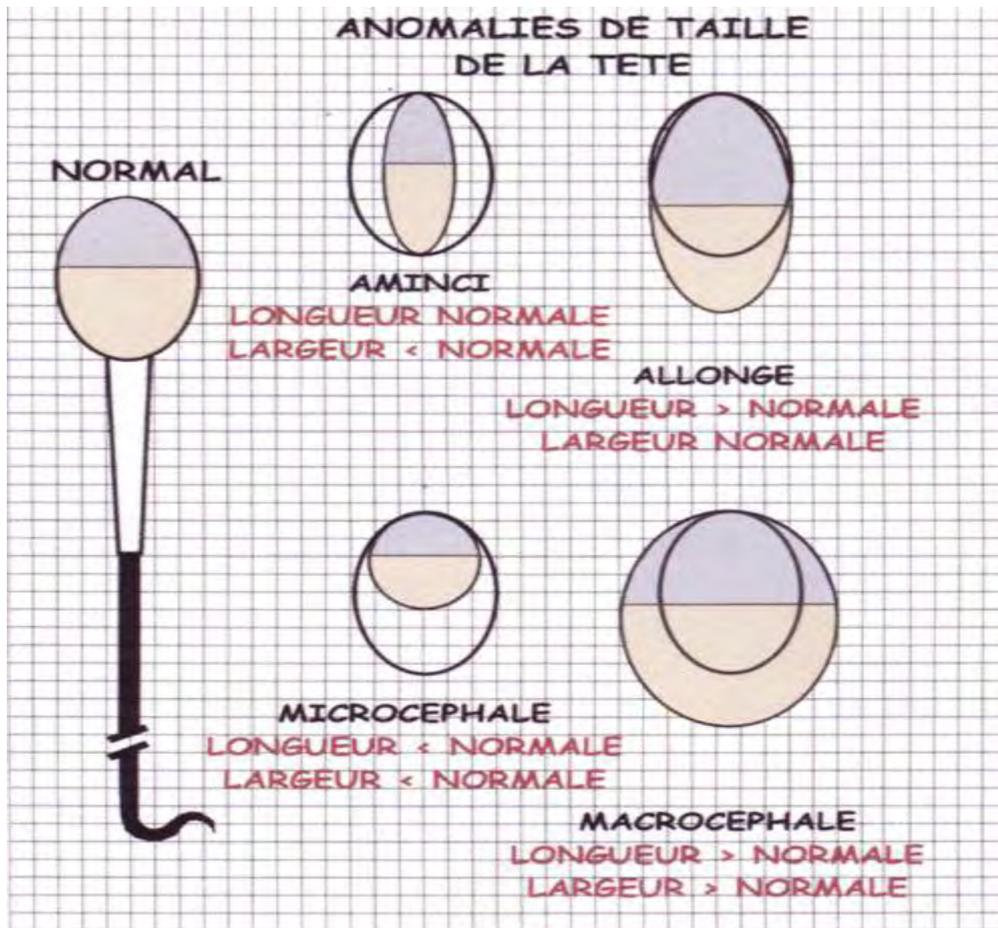


Figure. 5 : Anomalies de taille de la tête des spermatozoïdes humains.

Têtes multiples : Il y a plus d'une tête par spermatozoïde. Elles peuvent être accolées et occuper une surface totale similaire à celle d'une seule tête ou bien être parfaitement dissociées (Fig. 6).

Anomalies de l'acrosome : On classe dans cette catégorie toute anomalie de taille, de contour ou de texture de la région acrosomique ainsi que l'absence d'acrosome. La surface de l'acrosome est inférieure à 40 % ou supérieure à 70 % de la surface totale de la tête (Fig. 6).

Anomalies de la base de la tête ou région post-acrosomique : Toutes les anomalies de cor



Optimized using
trial version
www.balesio.com

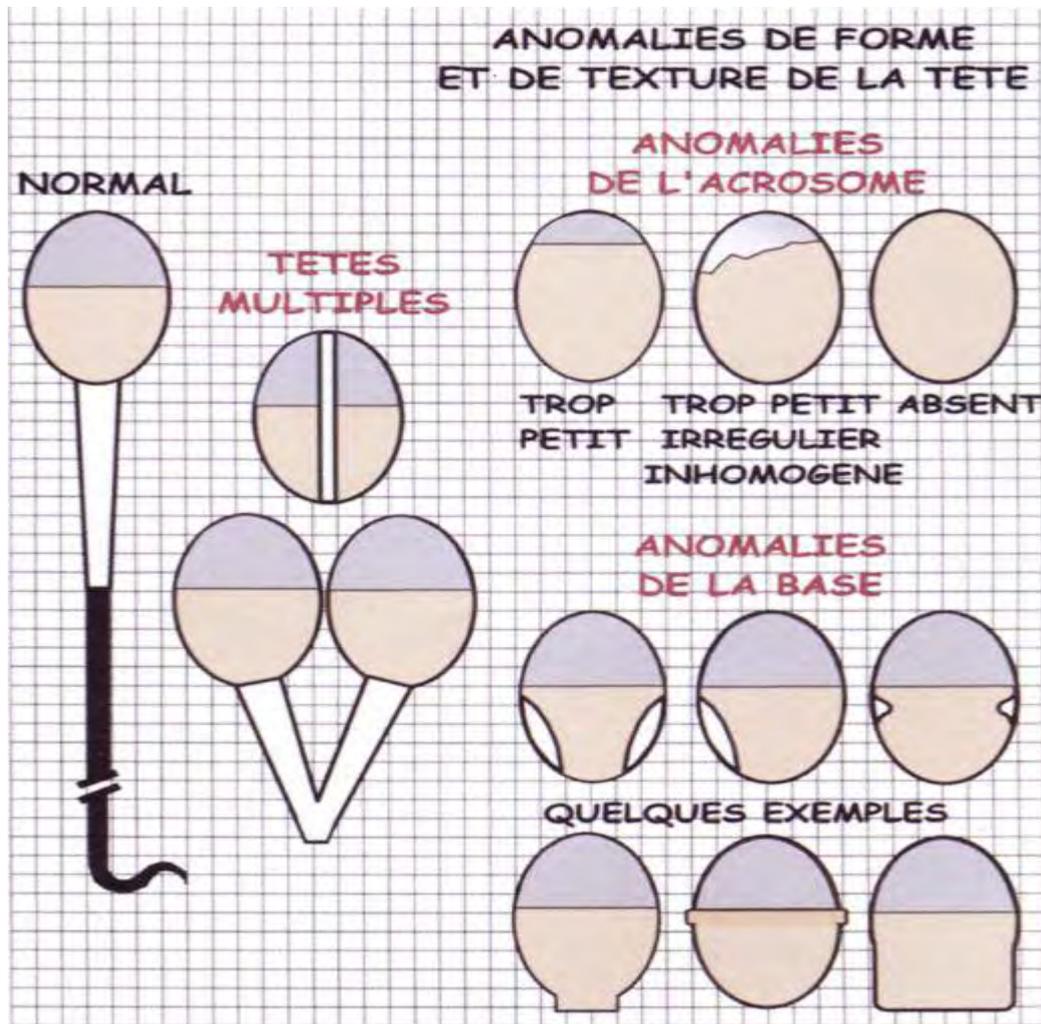


Figure. 6 : Anomalies de forme et de texture de la tête des spermatozoïdes humains.

Reste cytoplasmique : le reste cytoplasmique est considéré comme une anomalie s'il a une surface supérieure au tiers de la surface d'une tête normale. Il se situe le plus souvent à la jonction de la tête et de la pièce intermédiaire et c'est pourquoi il est classé comme anomalie de la pièce intermédiaire mais il peut également entourer l'ensemble de la cellule (souvent dans le cas de spermatozoïdes enroulés) ou englober seulement la tête (Fig. 7).

Pièce intermédiaire grêle: le diamètre de la pièce intermédiaire est égal ou inférieur au diamètre de la pièce principale dans sa partie initiale. Cette anomalie correspond à une gaine qui ne s'est pas constituée (Fig. 7).

Anomalie de l'axe de la pièce intermédiaire et de la tête ou de la pièce principale : l'axe de la pièce intermédiaire et l'axe de la tête ou l'axe de la pièce principale ne sont pas alignés à un angle net ou encore le flagelle n'est pas implanté dans l'axe de la tête. Ces anomalies sont bien visibles en microscopie électronique. Elles se présentent sous la forme d'une précurseur à la jonction de la pièce intermédiaire et de la pièce principale



ou plus loin sur le flagelle et régulièrement les structures axonémales et périaxonémales en regard sont désorganisées (Fig. 7).

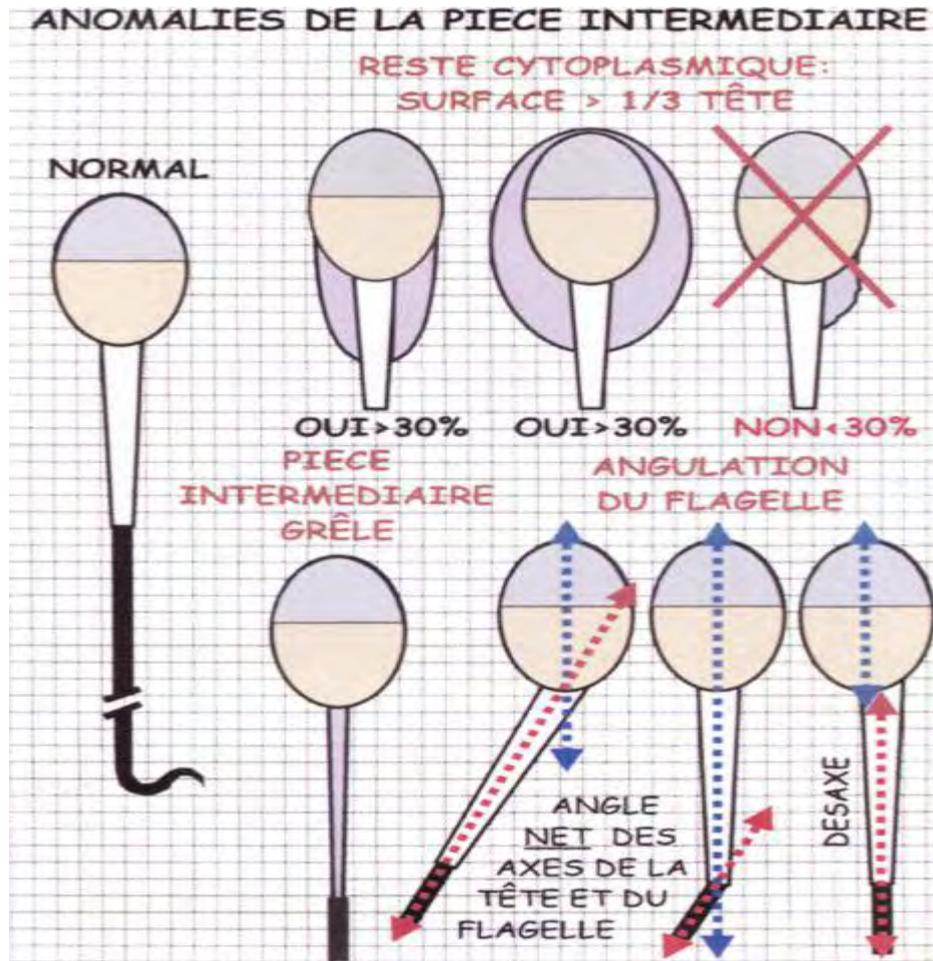


Figure. 7 : Anomalies de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes humains.

Flagelle absent : les têtes isolées sont comptées dans cette catégorie. La pathologie ultrastructurale intéresse les colonnes striées qui sont absentes et/ou la pièce connective qui est rudimentaire (fig. 8).

Flagelle court : le flagelle est significativement écourté (<5 fois la longueur de la tête).

La microscopie électronique à transmission indique parfois que le flagelle est court du fait d'une brièveté de la pièce intermédiaire mais, le plus souvent, on observe des flagelles courts et épaissis avec une prolifération des éléments composant la gaine fibreuse. Ces flagellonnels (fig. 8).

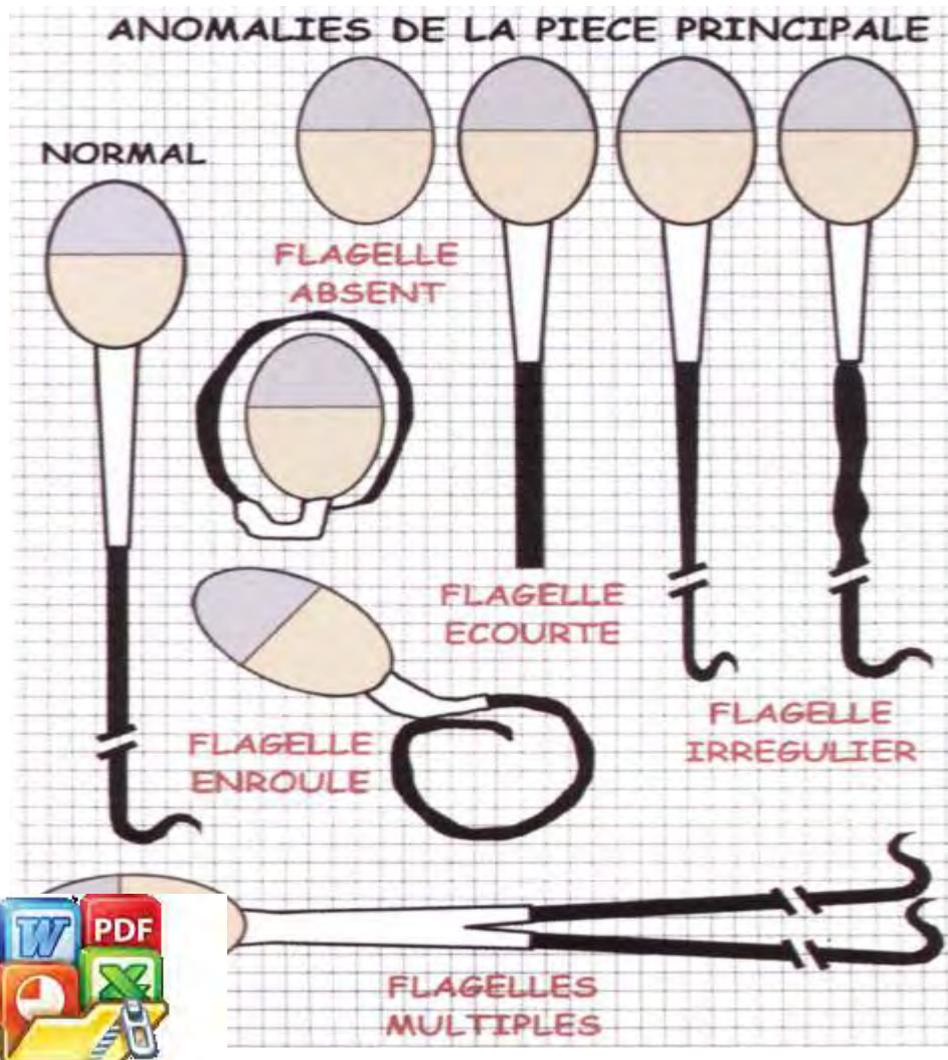
Fla diamètre de la pièce principale est variable, présentant des rétrargissements. En microscopie électronique à transmission, cette and es désorganisations étagées de l'axonème et/ou du périaxonème (fig.



Optimized using trial version
www.balesio.com

Flagelle enroulé : Le flagelle est enroulé autour de la tête ou en dehors de la tête. En microscopie électronique à transmission, on observe des coupes transversales multiples de flagelles correspondant à des niveaux différents au sein d'un même reste cytoplasmique, parfois des incidences longitudinales plus rares montrant nettement un enroulement du flagelle autour de la tête. Sur les coupes transversales de flagelle, on observe des désorganisations de la disposition circulaire stricte des différents éléments de l'axonème et du périaxonème dont certains manquent.

Flagelles multiples : il y a plus d'un flagelle par spermatozoïde, la pièce intermédiaire étant commune ou multiple. En microscopie électronique à transmission, on observe des têtes spermatiques bien isolées avec deux (et plus) plaques basales et deux (et plus) pièces connectives (fig. 8).



Optimized using
trial version
www.balesio.com

anomalies de la pièce principale des spermatozoïdes humains

<ul style="list-style-type: none"> Les anomalies de la tête. 		
FORMES ALLONGEES	<ul style="list-style-type: none"> Simple 	
	<ul style="list-style-type: none"> Base amincie 	
	<ul style="list-style-type: none"> Battant de cloche 	
	<ul style="list-style-type: none"> Effilés 	
FORMES AMINCIES		
MICROCEPHALES		
MACROCEPHALES		
DUPLIQUEES		
FORMES IRRÉGULIERS	<ul style="list-style-type: none"> Contour irrégulier 	
	<ul style="list-style-type: none"> Acrosome mal formé 	
	<ul style="list-style-type: none"> Sans acrosome 	
FORME EN LYSE		
<ul style="list-style-type: none"> Les anomalies de la pièce intermédiaire 		
RESTES CYTOPLASMIQUES		
ANGULATION		
<ul style="list-style-type: none"> Les anomalies du flagelle 		
FLAGELLES ABSENTS		
FLAGELLES COURTS		
FLAGELLES ENROULES		
FLAGELLES DOUBLES		
Autres <ul style="list-style-type: none"> Flagelles isolés Présence cellules de la lignée spermatique Des éléments à signaler. 		



ation de David 1995 des anomalies morphologiques des
t Bennet, 1986).

Optimized using trial version
www.balesio.com

ertilité masculine

que est une étape fondamentale car le pronostic et les options
thérapeutiques en dépendent. On reconnaît cinq grands mécanismes d'altération de la

fertilité masculine: les troubles érectiles, éjaculatoires et sexuels, les causes endocriniennes, les causes testiculaires, les causes obstructives séminales et les altérations fonctionnelles des spermatozoïdes. Plusieurs facteurs d'infertilité peuvent coexister chez un même patient, et certains facteurs agissent sur la fertilité par des mécanismes différents.

VII.1. Causes prétesticulaires :

VII.1.1. Causes endocriniennes

- Insuffisance hypothalamohypophysaire : L'insuffisance de production de la GnRH et/ ou un déficit de production de la FSH et de la LH hypophysaires entraînent un hypogonadisme hypogonadotrope (testostostérone, FSH, LH basses) avec une altération de la spermatogenèse (azoospermie sécrétoire).

- Freination de l'axe hypothalamo- hypophysaire: Cet axe est en outre particulièrement sensible à l'effet freinateur de plusieurs médicaments (antihypertenseurs, psychotropes, hormones...) (Rowe et al., 2000 ;Turek et Pera., 2002; Meschede et al., 1997), des œstrogènes (origine tumorale, hyperthyroïdie, obésité et éthylisme chronique), des androgènes (origine tumorale, hyperplasie congénitale des surrénales, hypothyroïdie) et de la prolactine (adénome hypophysaire à prolactine ou hypothyroïdie).

VII.2. Causes testiculaires

Insuffisance testiculaire

Les causes testiculaires d'infertilité peuvent être chromosomiques ou non chromosomiques. On parle d'hypogonadisme hypergonadotrophique.

■ Causes chromosomiques

6 à 13 % des hommes infertiles ont des anomalies chromosomiques sur leur caryotype.

Parmi ces anomalies, on peut citer :

- le syndrome de Klinefelter (47, XXY) est la plus importante et la plus fréquente des anomalies;
- les hommes XY Y et les hommes XX;

- le
- le
du



partout la région AZF (azoospermic factor) située sur le bras long

mosomiques

culaire non chromosomique peut être idiopathique ou acquise.

Parmi ses causes, on peut citer les pathologies suivantes :

- varicocèle, cryptorchidie

- traumatisme testiculaire
- orchite ourlienne
- tumeurs testiculaires
- chimiothérapie (surtout les alkylants comme la cyclophosphamide), la radiothérapie
- consommation excessive de tabac, d'alcool et de stupéfiants qui peut entraîner une insuffisance testiculaire.

Cependant, malgré une recherche étiologique approfondie, 25 % des cas d'infertilité masculine restent idiopathiques.

■ Causes post-testiculaires

Elles représentent l'ensemble des problèmes qui empêchent le cheminement des spermatozoïdes dans les voies génitales de l'homme et /ou de la femme. On distingue ainsi parmi les causes post testiculaires d'infertilité :

VII.3 Les troubles érectiles et éjaculatoires

Ils empêchent la déposition des spermatozoïdes en intra-vaginale.

VII.4 L'obstruction des voies séminales

Causes obstructives d'infertilité

- Agénésie vésiculodéférentielle bilatérale congénitale : c'est une forme génitale de la mucoviscidose. Elle est due à la mutation de gène de la mucoviscidose CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). On peut également retrouver une agénésie unilatérale ou une agénésie des canaux éjaculateurs (Barthelemy, 2003; Schlosser et al., 2007).
- Obstruction acquise : elle est surtout de nature infectieuse (infections sexuellement transmissibles, tuberculose génitale...), traumatique, tumorale (obstructions des canaux éjaculateurs) ou iatrogène (chirurgie de la hernie, varicocèle, hydrocèle).

VIII. Assistance médicale à la procréation (AMP)

Une AMP ne peut se concevoir qu'au sein d'équipes multidisciplinaires cor
ées et équipées. Malgré leur succès, les techniques d'AMP restent
un
ique de l'infertilité lorsque la cause n'a pas été identifiée et / ou
cor



n artificielle avec sperme du conjoint

la-utérine consiste à déposer les spermatozoïdes mobiles au fond
de la cavité utérine au cours de cycles stimulés et monitorés. L'inséminat doit contenir 500
000 à 1 million de SPZ mobiles concentrés dans un volume de 0,2 à 0,3 ml.

Ces inséminations sont indiquées dans les troubles de l'éjaculation, de l'hypospadias sévère, dans les oligozoospermies isolées, dans certaines infertilités immunologiques, ainsi qu'en cas de stérilité inexplicée.

VIII.2 Fécondation in vitro (FIV)

Les ovocytes sont mis en contact avec une préparation de 50 000 à 200 000 spermatozoïdes par ml. 42 à 48 heures après, deux, voire trois, embryons sont sélectionnés et transférés dans la cavité utérine. Les chances de grossesse après transfert embryonnaire sont de l'ordre de 27 % pour chaque embryon transféré. Les infertilités masculines, immunologiques ou inexplicées peuvent bénéficier avec succès de la FIV.

VIII.3 Technique de fécondation avec micromanipulation : injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI)

Elle permet l'interaction ovocyte-spermatozoïde en supprimant les obstacles mécaniques que constituent la zone pellucide et la membrane plasmique ovocytaire. Le spermatozoïde sélectionné et injecté doit être de morphologie normale et vivant.

L'ICSI avec spermatozoïde éjaculé est réservée aux infertilités sévères (< 500 000 spermatozoïdes/ ml) et aux échecs de la FIV. Elle peut être réalisée avec des spermatozoïdes, frais ou congelés, prélevés au niveau déférentiel, épидидymaire ou testiculaire. Les taux de grossesse clinique sont de l'ordre de 25 % par transfert.

L'ICSI est réservée aux infécondités masculines sévères : azoospermie avec prélèvement chirurgical des spermatozoïdes, oligo et/ou astheno et/ou tératospermie majeure et auto-immunisation anti spermatozoïde sévère.

L'ICSI constitue une véritable révolution dans le domaine de l'infertilité masculine (notamment dans le cas des azoospermies sécrétoires).

VIII.4 Conseil génétique

tra
Le
car
cau
gène
pour éviter le risque de

les barrières de sélection naturelle, l'ICSI rend possible la génétique d'infertilité ou d'autres handicaps pour la descendance. Le problème est donc primordial et la décision repose sur les données du ; microdélétions du chromosome Y, de la pathologie génétique du gène de la mucoviscidose CFTR. En cas de mutation de ce gène chez l'homme, l'étude du gène CFTR chez la conjointe prend toute son importance pour éviter le risque de mucoviscidose pour la descendance (Farih, 2010).



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Chapitre II :

ASPECTS GENETIQUES DE LA TERATOZOOSPERMIE



Optimized using
trial version
www.balesio.com

L'identification de nouveaux gènes impliqués dans des formes rares d'infertilité (Tératozoospermie)

Le concept de la tératozoospermie devrait peut-être être revu car il est basé sur l'identification des formes atypiques de spermatozoïdes, mais sans prendre en compte la cause de l'anomalie. Il paraît important de chercher l'étiologie responsable des anomalies observées.

Une évaluation de la morphologie des spermatozoïdes présentant une forme anormale par immunohistochimie ou une analyse moléculaire pourrait permettre une caractérisation des anomalies des spermatozoïdes. Cette approche va au-delà de la morphologie des spermatozoïdes, l'idée principale est d'apporter un éclairage sur la physiopathologie des anomalies des spermatozoïdes basée sur l'étude des modifications structurales et moléculaires de différentes composantes de la spermatogenèse.

1. Le syndrome des spermatozoïdes macrocéphales

La macrocéphalie est la seule anomalie morphologique des spermatozoïdes directement et constamment corrélée à la présence d'anomalies chromosomiques. Le syndrome des spermatozoïdes macrocéphales polyflagelles a été décrit en 1977 par Nistal et al (Nistal et al., 1977), il est caractérisé par une macrocéphalie majeure avec des anomalies de la forme de la tête et de l'acrosome, et la présence de plusieurs flagelles.

L'analyse ultrastructurale de ces spermatozoïdes a montré une augmentation de la taille du noyau d'un facteur 3 et un nombre moyen de flagelles par spermatozoïde de 3,6 (Escalier, 1983) (fig. 10). Le caryotype de ces patients est normal, mais l'hybridation in situ (FISH) met en évidence la présence d'anomalies chromosomiques dans tous les spermatozoïdes, aneuploïdies ou polyploïdies (tétraploïdies et diploïdies, plus rarement triploïdies) (Devillard et al., 2002), (Perrin et al., 2008). Cette anomalie qui touche la totalité des spermatozoïdes s'associe à une oligo-astheno-tératozoospermie sévère (OAT)

et l'absence de spermatozoïdes fonctionnels est une contre-indication à toute procréation médicalement assistée. L'approche moléculaire dans la recherche des mutations utilisant la PCR par filiation a permis de montrer qu'une mutation du gène Aurora kinase est responsable de ce syndrome.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

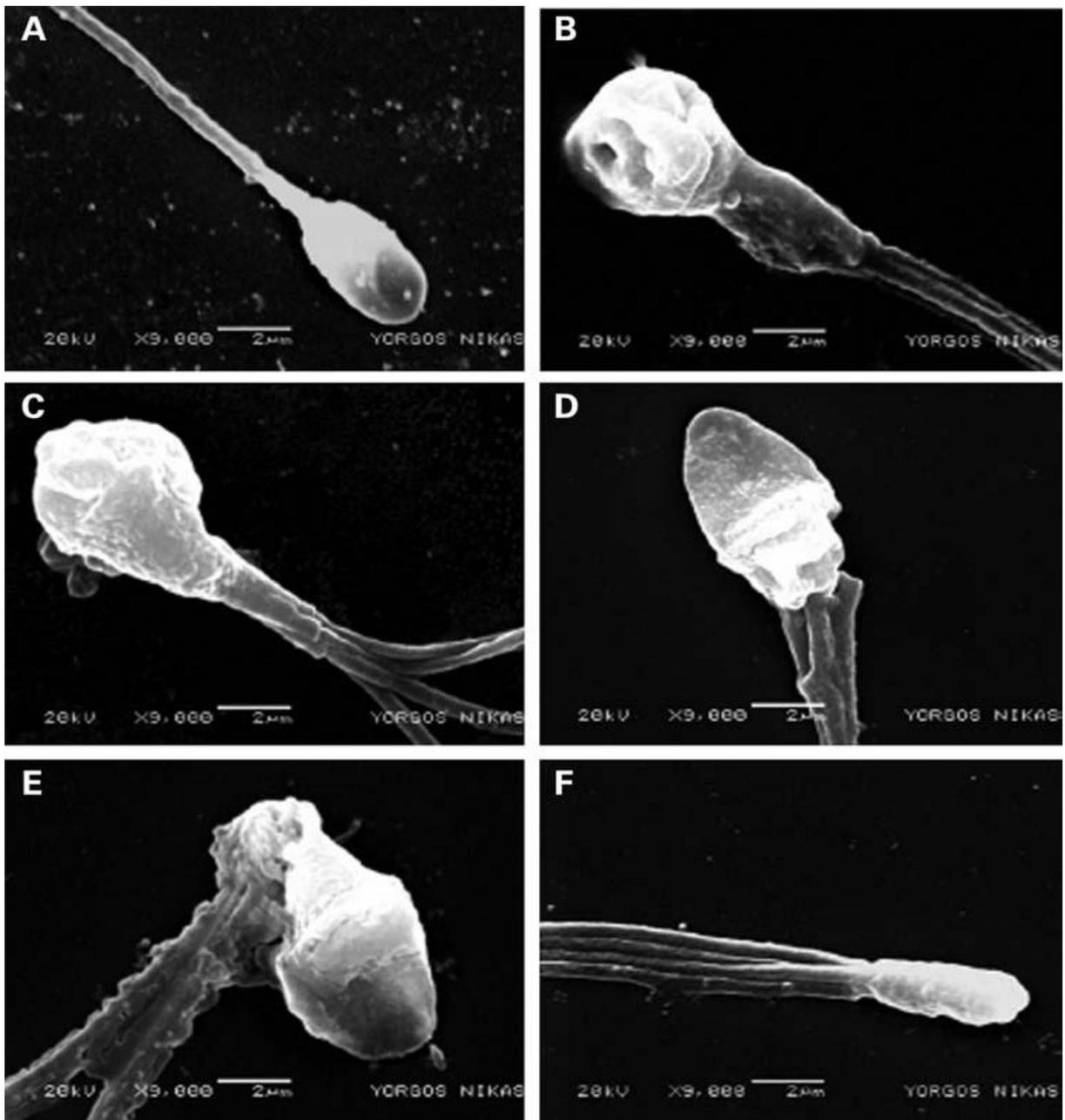


Figure. 10 : Photos MEB (X 9000) des spermatozoïdes caractéristiques d'un patient homozygote pour la mutation c144delC (B-F) comparé avec des spermatozoïdes typique d'un donneur fertile (A). Tête normale (A), grosse tête (B-E), contour irrégulier de la tête (B et C), plusieurs flagelles (B-E), l'implantation de plusieurs flagelles comme on le voit au niveau de la base du flagelle (E), plusieurs flagelles décapités (F) (Dieterich et al., 2009).



1.1 **Identification d'un gène pathogène par cartographie d'homozygotie.**

Optimized using trial version www.balesio.com technologies autosomiques récessives, l'approche par cartographie d'homozygotie permet d'identifier les régions d'homozygotie communes à plusieurs

patients et de localiser des régions d'intérêt pouvant contenir la mutation responsable. Cette stratégie, décrite en 1987 par Lander et Botstein (Lander et Botstein, 1987), s'applique à des patients présentant un phénotype caractéristique et issus de familles consanguines ou venant d'un même groupe ethnique ou géographique. Cette approche positionnelle d'analyse globale des polymorphismes du génome avec des puces à ADN de type SNP (single nucleotide polymorphism) a permis d'identifier une région candidate à l'extrémité du bras long du chromosome 19 en 19q13.43 (Fig.11). Le risque pour un couple issu d'une même famille de donner naissance à un enfant homozygote pour une mutation récessive se trouve donc augmenté par rapport à la population générale.

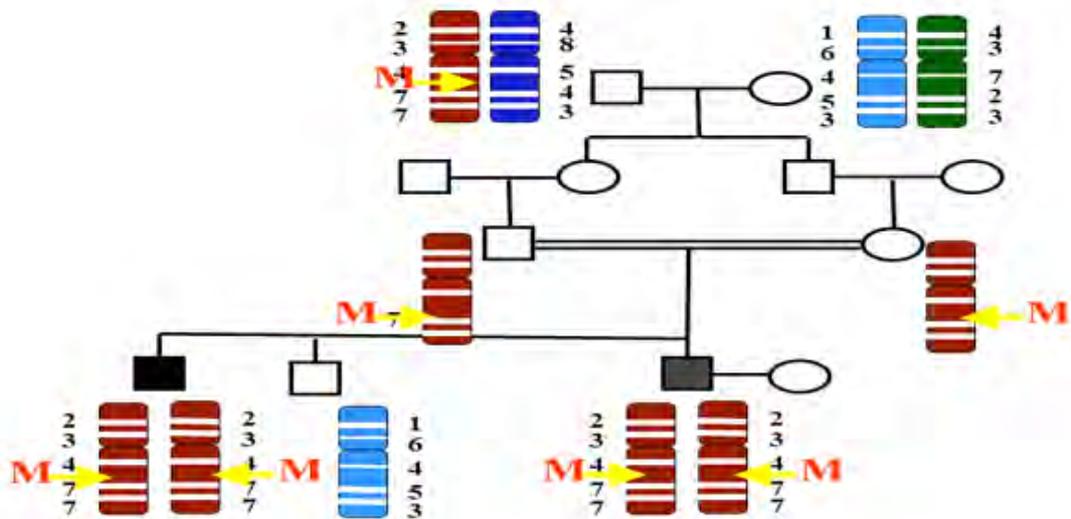


Figure. 11 : Exemple d'une famille consanguine montrant la transmission d'une mutation M

Ainsi, une même mutation homozygote sur le gène *AURKC* (c.144delC) a été identifiée chez 14 patients nord-africains initialement testés (Dieterich et al., 2007). Le gène *AURKC* code pour une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille Aurora, exprimé dans les testicules et impliquée dans la ségrégation des chromosomes lors de la méiose. La mutation initiale (c.144delC) conduit à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle : un arrêt de la ségrégation des chromosomes durant la méiose et l'apparition de spermatozoïdes tétraploïdes. L'étude des haplotypes montre que cette mutation a dérivé d'un ancêtre commun apparu il y a environ 15 siècles (Dieterich et al., 2007).



Optimized using trial version
www.balesio.com

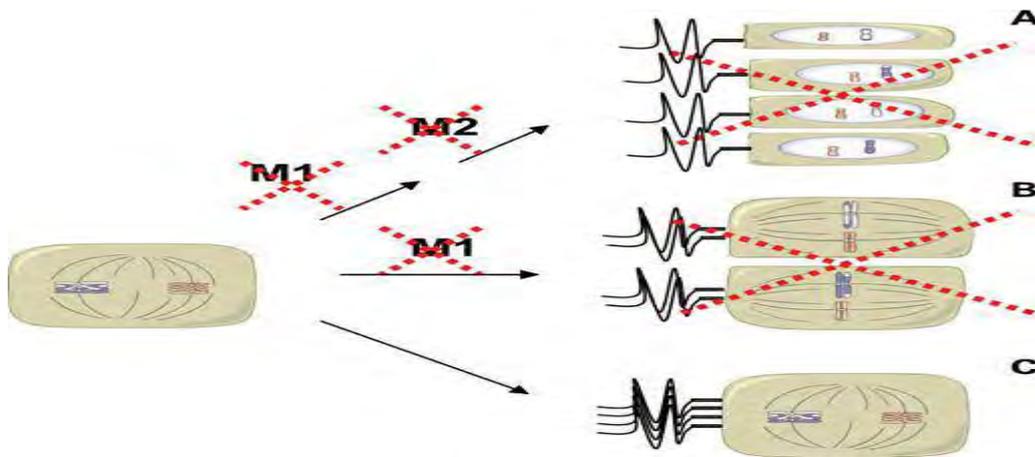


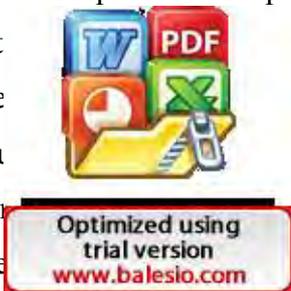
Figure. 12 : L'absence de la protéine AURKC entraîne un blocage des deux divisions méiotiques. Chez l'homme fertile, le spermatocyte (à gauche) va subir deux divisions méiotiques (M1, M2) qui vont permettre de produire quatre gamètes haploïdes. Le blocage méiotique pourrait se produire après la première division (M1) mais on a observé que les spermatozoïdes macrocéphales étaient tétraploïdes. On conclut donc que l'absence de la protéine fonctionnelle AURKC entraîne un blocage après la phase S de réplication de l'ADN et avant la première division méiotique (Dieterich et al., 2009).

1. La globozoospermie

C'est une pathologie rare dont la fréquence est inférieure à 0,1 %. Elle se manifeste, dans sa forme typique (type I) décrite par Schirren et al. (Schirren et al., 1971), par la présence de 100 % de spermatozoïdes dont la tête est ronde sans acrosome. Le phénotype était décrit il ya plus de 30 ans, et les cas familiaux ont souligné une composante génétique de ce défaut. Une mutation homozygote a été récemment identifiée dans le gène SPATA16 (c.848G-A) chez trois frères présentant une globozoospermie de type 1 (Dam et al., 2007). Ces données suggèrent que malgré un phénotype commun, la globozoospermie n'est pas homogène du point de vue génétique. À partir d'une cohorte de

pat
spe
nou
pri
che

tant un tableau clinique de globozoocéphalie avec 100 % de
is d'acrosome, la stratégie de cartographie d'homozygotie a de
fier une région d'intérêt contenant le gène *DPY19L2* exprimé
testicules. Une délétion totale du gène *DPY19L2* était présente
analysés (Harbuz et al. 2011).



L'analyse de la région entourant DPY19L2 a permis d'identifier des séquences dupliquées de type LCR (low copy repeat) situées de part et d'autre du gène. Ces séquences favorisent la survenue d'une délétion par un mécanisme de recombinaison homologue non allélique (NAHR). Ce mécanisme est connu en pathologie humaine (Stankiewicz et Lupski, 2010). Le résultat de cette recombinaison illégitime est la constitution de deux gamètes mâles, l'un porteur de deux copies du gène DPY19L2 (duplication) et l'autre dépourvu de copie (délétion) (Fig. 13, 14, 15).

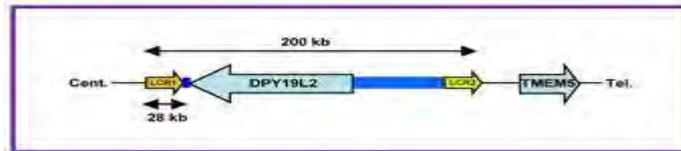


Figure. 13 : Structure génomique au locus DPY19L2

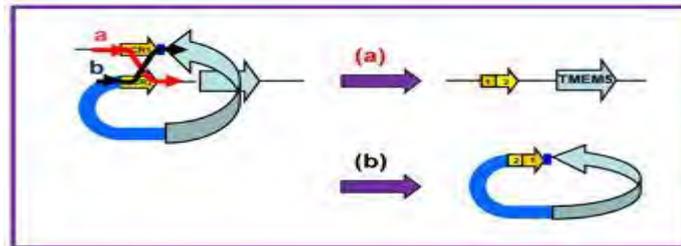
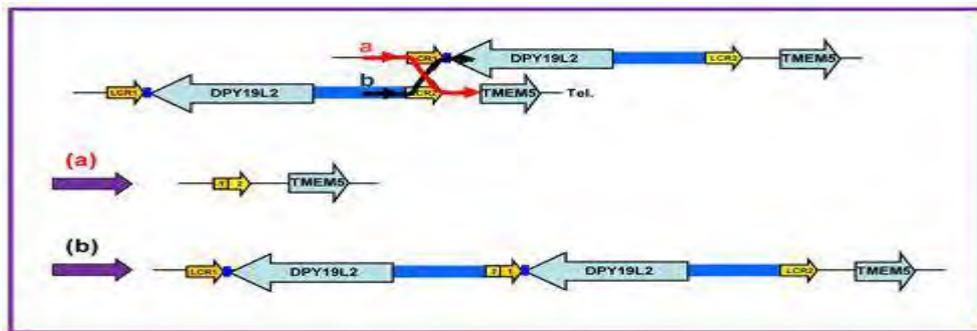


Figure. 14 : Mécanisme de NAHR intra-chromatidien



Rej (N. isme de NAHR inter-chromatidien ou inter-chromosomique que du mécanisme de recombinaison homologue non-allélique L2.



1- Le gène DPY19L2 est entouré de deux séquences dupliquées, LCR1 et LCR2, qui présentent 99% d'homologie. Au cours de la prophase méiotique, ces deux séquences homologues non-alléliques peuvent s'apparier et se recombiner par NAHR.

2- Lorsque les deux séquences qui s'apparient sont situées sur une même chromatide, la recombinaison par NAHR génère un gamète dépourvu de la région comprise entre les deux LCR (a) et une molécule d'ADN circulaire qui contient le gène DPY19L2 (b) et qui sera par la suite éliminé.

3- Lorsque les deux séquences qui s'apparient sont situées sur deux chromatides ou chromosomes homologues distincts, la recombinaison par NAHR génère deux gamètes, l'un porteur d'une délétion (a), l'autre d'une duplication (b) de la séquence comprise entre les deux LCR et renfermant le gène DPY19L2. Globalement, le mécanisme de NAHR produit plus de délétions que de duplications puisque le mécanisme de NAHR intra-chromatidien (2) ne génère que des délétions et que le mécanisme de NAHR inter-chromatidien ou inter-chromosomique (3) génère autant de duplications que de délétions (© AGIM, Pierre Ray).

La délétion du gène DPY19L2 est aujourd'hui l'anomalie génétique responsable de la très grande majorité des cas de globozoospermie. La fréquence de la délétion hétérozygote est estimée à environ 1/220 dans la population générale, soit une fréquence de la maladie proche de 1/200 000 alors que l'incidence de la globozoospermie est estimée à moins de 1 ‰ chez les hommes infertiles (Koscinski et al., 2011). Il semble donc que d'autres gènes puissent être impliqués dans ce phénotype et, notamment, les différents gènes codant pour des protéines partenaires de DPY19L2. Chez l'homme, la fonction du gène DPY19L2 était jusqu'alors inconnue. Une seule étude avait démontré que DPY19, l'équivalent du gène humain chez le ver *Caenorhabditis elegans*, était nécessaire à la polarité et à la migration des neuroblastes durant la morphogenèse du nématode (Holtzman et al., 2000). Le spermatozoïde, au même titre que les neurones, est une cellule polaire. Par conséquent, l'absence de la protéine DPY19L2 pourrait rendre déficient le centrosome et de l'incapacité des spermatozoïdes des patients atteints de globozoospermie de mener à l'élargissement de leur tête spermatique.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

3. Les anomalies qui touchent la pièce intermédiaire du spermatozoïde

3.1. Les spermatozoïdes sans tête (décapités, acéphaliques, pinheads) ou flagelles isolés

C'est une affection rare chez l'homme qui se manifeste par une infertilité primaire et une oligo-asthéo-tératozoospermie liées à une grande fragilité de la jonction de la tête et du flagelle du spermatozoïde. Elle peut correspondre à un défaut de migration du centriole au pôle caudal du noyau de la spermatide durant la spermatogenèse. A l'examen direct du sperme, on peut voir de nombreuses têtes sans flagelle, des flagelles sans têtes, des angulations, et la simple manipulation du spermatozoïde sépare le flagelle et la tête. Parfois, on observe la présence d'une gouttelette cytoplasmique à l'extrémité proximale du flagelle d'où le nom de « pinhead » donné aussi à ces spermatozoïdes. L'étude ultrastructurale a défini les lésions qui affectent la totalité ou une grande proportion des spermatozoïdes dans ce syndrome, il s'agit d'une absence de fossette d'implantation et de plaque basale au niveau de la partie postérieure du noyau (Guichaoua et al., 2009).

En microscopie optique, ce phénotype est le plus souvent homogène avec l'observation de très nombreux flagelles mobiles dépourvus de têtes, et de très nombreuses têtes dépourvues de flagelles. La séparation de la tête et du flagelle a certainement lieu dans le testicule ou dans l'épididyme. Les flagelles sans tête sont cependant mobiles et pénètrent dans le mucus cervical.

En microscopie électronique, la cause principale est l'absence de plaque basale au niveau de la partie postérieure du noyau (Baccetti et al., 1984). L'étiopathogénie de ce syndrome n'est pas claire, il s'agit probablement d'une défaillance de la fonction du centriole/centrosome proximal, celui-ci étant incapable d'induire la formation de la fossette d'implantation et de la plaque basale, soit parce qu'il ne peut migrer jusqu'au pôle caudal du noyau du spermatozoïde, soit parce qu'il présente une anomalie fonctionnelle (Guichaoua et al., 2009). Baccetti et al. (Baccetti et al., 1984) ont décrit une surproduction de l'appareil de Golgi chez un homme présentant le syndrome des spermatozoïdes sans tête, elles empêcheraient la fixation du centriole au noyau. Les spermatozoïdes sans tête et les spermatozoïdes sans flagelle dans le syndrome présentent une stérilité primaire sans autre désordre fonctionnel. La fécondation naturelle ne peut pas avoir lieu du fait de l'absence de têtes. Le seul traitement est la fécondation assistée avec injection des spermatozoïdes dans l'ovocyte (ICSI).



DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODES



Optimized using
trial version
www.balesio.com

**Chapitre. 1 : ETUDE
EPIDEMIOLOGIQUE ET
CYTOLOGIQUE DES INFERTILITES
MASCULINES**



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Réalisation du protocole

Population cible

Il s'agit d'une étude rétrospective descriptive portant sur 599 dossiers de patients ayant consulté entre janvier 2011 et février 2012 au centre de procréation médicalement assisté (PMA) de la clinique Ibn Rochd, Constantine. Dans tous les cas les patients étaient référés à la clinique par leur médecin traitant pour diagnostic d'infertilité. Quatre cent quatre patients ont été retenus dans cette étude ils répondaient aux critères d'inclusion :

- 1) homme marié depuis plus d'un an,
- 2) spermogramme et/ou un spermocytogramme pathologique,

3) le recours à l'une des techniques de PMA a été préconisé. Les hommes ayant un spermogramme et spermocytogramme normal et destiné à faire une PMA avec une indication féminine ont été exclus.

A travers un questionnaire, chaque patient a été interrogé sur les paramètres suivants :

1. Les paramètres étudiés

1.1 Paramètres épidémiologiques

Age, profession, lieu d'habitat, les facteurs mode de vie (activité physique, consommation de tabac, cigarette et alcool, les bains chauds, exposition à la chaleur, aux agents toxiques et aux radiations)

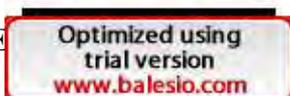
* **L'âge** est déterminé pour le patient et sa conjointe.

* **La profession** : chaque patient doit préciser sa profession.

* **Lieu d'habitat** : Tous les patients qui résident dans l'Est Algérien sont recrutés.

* **Mode de vie** : Le statut tabagique (fumeur, non fumeur, nombre de cig. par jour.), Consommation d'alcool (consommation modérée ou exc. ds (combien de fois par semaine).

* **Facteurs de risque** :



Tout patient est interrogé s'il est exposé à des températures élevées dans leur milieu de travail

***Exposition aux agents toxiques** : pesticides et métaux lourds notamment.

***Exposition aux radiations** : Il s'agit des UV les rayons X, surtout pour les radiologues.

***Activité physique** :

Le but est de savoir si le patient pratique régulièrement le sport, quel type de sport, rarement, en arrêt d'activité ou ne pratique pas de sport.

1.2. Les paramètres cliniques :

Type et durée d'infertilité, poids, antécédents urogénitaux, médicaux, familiaux, la consanguinité de couple, la consanguinité des parents, et problème parental pour avoir des enfants.

* **Type d'infertilité** : primaire ou secondaire

* **Durée d'infertilité** : pour l'infertilité primaire on cherche à savoir depuis combien d'années il désire un enfant. Pour l'infertilité secondaire combien d'années il n'a pas pu procréer après le dernier enfant

* **Poids** : est mesuré en Kg pour savoir si le patient est en surpoids, obèse ou ayant un poids normal par le calcul de l'IMC.

* **Antécédents urogénitaux** : Antécédents de varicocèle, hydrocèle, ectopie testiculaire, hernie inguinale et s'il a subi des interventions chirurgicales.

* **Antécédents médicaux** : Problème d'HTA, diabète ou autres maladies, s'il a pris des médicaments de quelle nature.

* **Antécédents familiaux** : Frères, sœurs, cousins et oncles s'ils ont eu des enfants et est-ce qu'ils ont eu un problème pour avoir des enfants.

* **Le problème des couples et des parents** : cette question concerne le couple et les parents ont-ils un problème de parenté ou pas.

* **Le nombre de tentatives de FIV et ICSI** : Le nombre de tentatives de FIV et ICSI du patient et le résultat positif ou négatif de chaque tentative.



*Un interrogatoire concernant la conjointe est également réalisé en insistant sur d'éventuelles interventions.

1.3. Paramètres paracliniques

Le spermogramme et le spermocytogramme constituent les examens clés de l'exploration de la fertilité masculine. Ils font partie du bilan d'infertilité et de stérilité du couple.

1.3.1. Le spermogramme et spermocytogramme

Techniques

Spermogramme

Le spermogramme reste un examen de première investigation dans l'exploration de la stérilité masculine, le recueil du sperme ainsi que les opérations effectuées demandent une attention particulière quant à leur réalisation.

1. Le prélèvement

Le patient doit être informé de certaines instructions concernant le recueil du sperme avant le jour de prélèvement à savoir :

Une abstinence de trois à quatre jours est recommandée

Le prélèvement se fait au laboratoire et le patient doit être informé sur l'importance de la totalité de l'éjaculat, car une fraction n'est pas représentative de l'ensemble de l'éjaculat.

Le sperme est recueilli par masturbation dans un récipient stérile avec couvercle contenant le numéro de patient

Arrêt de tout traitement susceptible d'avoir une action sur la spermatogenèse

2. Lic

De



e est très visqueux à l'éjaculation.

Le

mn

erme doit être mis rapidement dans une étuve à 37°C pendant 30 minutes. Une liquéfaction prolongée doit être notée si l'éjaculat ne se liquéfie pas après ce délai.



3. Examen macroscopique

L'examen commence juste après le temps nécessaire à la liquéfaction :

Le volume, Le pH, la couleur, l'évaluation de la viscosité (A l'aide d'une pipette Pasteur, on observe l'écoulement du sperme contre une paroi.), l'odeur sentie est notée

4. Examen microscopique

Il permet la numération et la mobilité des spermatozoïdes ainsi que la présence d'éventuelles agglutinations spermatiques et d'autres éléments cellulaires.

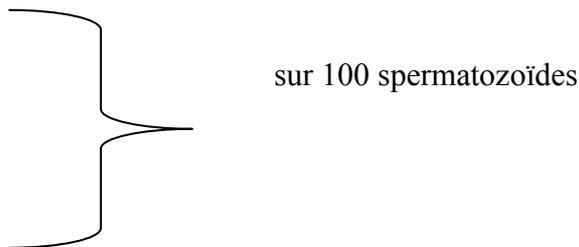
La mobilité

1. Le sperme est bien homogénéisé pour remettre en suspension les spermatozoïdes.
2. Une goutte calibrée de 10ul est placée entre lame et lamelle et examinée au microscope optique.

Il faut faire le tour de la lame, ce qui permet de détecter s'il ya lieu des agglutinats et signaler leur importance.

On détermine le pourcentage des spermatozoïdes :

- rapides
- lentes
- agitées
- nulles



La numération

C'est une évaluation quantitative du nombre des spermatozoïdes/ ml de sperme.

Gé dilution au 1/10.

0. ml de liquide de ringer formolé sont associés dans un tube à
hér

-O r la cellule de Malassez préalablement préparée.



-Après 10 minutes de repos, la lecture est réalisée par comptage des spermatozoïdes sur chaque grille. La lecture se fait par un comptage du nombre de spermatozoïdes de cinq rectangles quadrillés.

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

$$C = N \times D_i \times V \times 1000$$

C : concentration millions/ml

N : nombre de spermatozoïdes comptés sur la totalité de la cellule.

D_i : dilution = 10

V : Volume = 10

1000 : conversion de cm^3

Cet examen permet d'adapter la dilution selon la concentration des spermatozoïdes.

La concentration des cellules rondes :

La concentration des cellules rondes est mesurée à l'état frais à l'aide de la cellule de Malassez.

La vitalité

Cet examen, nous permet d'estimer la nécrozoospermie, le nombre de spermatozoïdes morts et vivants.

Une goutte de sperme est mélangée à une goutte d'Eosine à 1 % dans un tube à hémolyse. Après 30 secondes d'incubation on rajoute 2 gouttes de Nigrosine à 10%. Le frottis est préparé à partir d'une goutte du mélange sur une lame, puis laisser sécher à l'air libre.

La
(10
viv
spe



n microscope photonique par le comptage de plusieurs champs
es) pour déterminer le pourcentage des spermatozoïdes morts et
lores pour les spermatozoïdes vivants et colorés en rose pour les

Spermocytogramme :

Principe

C'est un examen médical correspondant à l'analyse cytologique et morphologique des spermatozoïdes au microscope, permettant l'évaluation de la fertilité masculine. La classification française de David subdivise les anomalies morphologiques des spermatozoïdes en 7 anomalies de la tête, 2 anomalies de la pièce intermédiaire et en 4 anomalies du flagelle.

Méthodologie

On met une goutte du sperme sur la lame, puis on tire la goutte à l'aide d'une autre lame d'une façon continue et on laisse les frottis sécher à l'air libre.

La fixation

On fixe les frottis dans l'alcool éther pendant 30 min.

La coloration

Les frottis sont déposés dans la batterie de coloration de Shoor, on monte les lamelles sur les lames colorées par l'EUKIT, on laisse sécher les frottis pendant 15min.

La lecture de la morphologie est effectuée sur 100 spermatozoïdes au grossissement à l'immersion 100x. Nous avons utilisé la classification de David (1975) qui recense :

-Des spermatozoïdes morphologiquement normaux :

Un spermatozoïde normal présente une tête ovalaire (vue de face) et légèrement allongée (vue de profil), sa longueur est de 4-5 μm et sa largeur est de 2.5 - 3.5 μm avec un acrosome bien délimité. La pièce intermédiaire doit avoir une largeur qui ne dépasse pas la moitié de la largeur de la tête, et doit être implantée dans l'axe longitudinal de la tête et ne présente pas de pointes ou de prolongations aiguës.

-les spermatozoïdes qui comptent :

• An

-Alors que les spermatozoïdes dont le rapport longueur/largeur >2 μm , peuvent être simple à base amincie, en battant de cloche, affilées.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

-Amincie : largeur nulle et longueur diminuée.

-Microcéphale: tête soit ronde, irrégulière avec anomalies fréquentes de l'acrosome.

-Macrocéphale : tête volumineuse.

-Irrégulière : déformation plus ou moins importante de l'ensemble de la tête avec irrégularité de l'acrosome.

-Dupliquée : bicéphale ou binucléés.

-En lyse : hétérogénéité coloration.

- Anomalies de la pièce intermédiaire

Reste cytoplasmique : sa surface doit être supérieure au moins à la moitié de la tête.

Angulée : l'axe de la pièce intermédiaire et l'axe de la tête forment un angle net ou encore le flagelle n'est pas implanté dans l'axe de la tête.

- Anomalies du flagelle

Absent.

Court : le flagelle est significativement écourté (<5 fois la longueur de la tête) avec généralement un épaississement et un contour plus ou moins régulier.

Enroulé : le flagelle est enroulé autour de la tête ou en dehors de la tête.

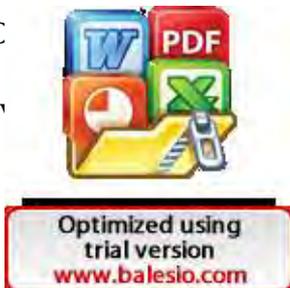
Double : il y a plus d'un flagelle par spermatozoïde, la pièce intermédiaire étant commune ou multiple.

1.3.3. Bilan infectieux :

Mycoplasmes : + - Chlamydia : + -

VE A : + - HIV1 : + -

HF + - Ag Hbs : + -



Technique d'ICSI

Prélèvement du sperme

Le sperme est obtenu par masturbation après une période d'abstinence de 3-5 jours il est fait au laboratoire le jour de la ponction ovocytaire

Préparation du sperme :

-La technique utilisée est la centrifugation sur gradient de densité 90/45.

Le sperme est liquéfié à la température du laboratoire pendant au moins une heure puis on procédera à une évaluation initiale du sperme frais (mobilité, concentration).

Les solutions de préparation (Puresperm100% et Fercicult-hepes) sont laissées à la température ambiante.

La manipulation se fait dans un tube conique 15ml de la façon suivante :

-100ul de Fercicult-hepes sont ajoutés à 900ul de Puresperm 100% (voir annexe1) pour obtenir 1000 ul de PureSperm 90%.

-550ul de Fercicult-hepes sont ajoutés à 450 ul de Puresperm 100 (voir annexe1) pour obtenir 1000ul de PureSperm 45%.

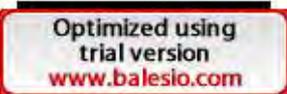
-A l'aide d'une pipette stérile, on dépose au fond du tube la fraction 90% sur laquelle on dépose la fraction 45% puis 1ml de sperme frais de façon très douce pour ne pas casser les deux fractions.

-Le tube est centrifugé à 300 g pendant 25 minutes.

-A l'aide d'une pipette stérile on aspire de façon circulaire jusqu'au fond du tube.

On ne laisse que 0,3 ml de la fraction 90% contenant le culot de sperme.

-L'  est dans un nouveau tube conique de 15 ml de centrifugation
cor de lavage (Fercicult Flushing medium, voir annexe 2).

-Le  300g pendant 10 minutes.

- A l'aide d'une pipette stérile on aspire le surnageant jusqu'au fond du tube contenant que le culot de sperme.

- 200 μ l de milieu ferticult hepes sont ajoutés au culot.

Evaluation des paramètres spermatiques après préparation

La numération des spermatozoïdes :

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

A l'aide d'une micropipette on aspire 10 μ l qu'on dépose dans la chambre de Makler

-Les spermatozoïdes sont ensuite comptés en utilisant un microscope à contraste de phase, à un grossissement final de x 200 ou x 400.

Le nombre de spermatozoïdes est calculé dans 10 carrés. Dans le cas d'une oligospermie, le nombre de spermatozoïdes doit être compté dans tous les carrés de la grille

La mobilité

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

Phase de blocage et superovulation

Les patientes ont subi le traitement hormonal suivant :

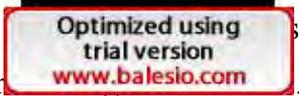
Les sécrétions hormonales des patientes ont été bloquées par un analogue agoniste de GnRH (Decapeptyl) selon un protocole court ou long.

Si le protocole est long l'injection de Decapeptyl se fait soit à raison de 3.75 mg le 21ème jour du cycle précédent soit à raison de 0.1 mg pendant 14 jours à partir de 21ème jour du cycle. Si le protocole est court l'injection (0.1mg) se fait à partir du 2ème jour du cycle.

Ø La stimulation ovarienne est réalisée par FSH recombinant (Puregon 100 UI ou gonalf 75 UI) et une injection de Decapeptyl à raison de 200 mg/j si puregon ou 225 UI si protocole long, et dans la 3ème jour du cycle dans le protocole court (20



Ø La stimulation est réalisée à partir du 8ème jour par l'échographie et par l'injection de FSH recombinant (Puregon 100 UI ou gonalf 75 UI) et une injection de Decapeptyl à raison de 200 mg/j si puregon ou 225 UI si protocole long, et dans la 3ème jour du cycle dans le protocole court (20



Ponction ovocytaire

- Lorsque le follicule atteint au moins 18 mm de diamètre, l'ovulation est déclenchée par un hCG recombinant (Ovitrelle) 6500 UI soit 250ug.
- La ponction se fait 36 heures après l'injection de l'Ovitrelle (100ug pour un follicule).
- Les follicules sont lavés dans un milieu de lavage, le Fercult Flushing medium (voir annexe2)
- La décoronisation (éclosion) des follicules est réalisée par l'ajout de 150 ul de l'hyaluronidase (Hyaluronidase in Fercult Flushing medium voir annexe 4)

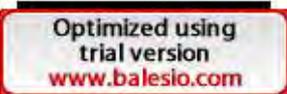
La microinjection

- Une microgoutte de 10ul de polyvinylpyrrolidone : PVP (10% PVP in FertiCult Flushing medium voir annexe 5) est étendu dans la boîte pétri.
- 1 ul de la suspension de sperme préparée est placée au milieu de cette gouttelette de PVP.
- 4 à 8 gouttelettes de 5 ul de milieu de culture des ovocytes, FertiCult IVF medium (voir annexe 9), sont mises autour de la gouttelette de PVP contenant les spermatozoïdes.
- Environ 4-5 ml de paraffine liquide ou huile minéral (Fercult Miniral Oil, voir annexe 6) sont doucement versés dans la boîte pour couvrir ces gouttelettes.
- La boîte est alors retournée à l'incubateur à 37 °C pendant environ 30 minutes avant de transférer les ovocytes dans les gouttelettes de culture prêtes pour l'ICSI.
- Après l'injection (par le biais d'un microscope OLYMPUS), les ovocytes fécondés sont mis dans l'incubateur (37°C, 5% CO2) jusqu'au 3ème jour (j3).

Evaluation de la fécondation et qualité des embryons

Les  es 18 à 20 heures après la micro injection.

La  : des embryons est évaluée 24 heures après la fécondation.

Le  ères utilisés dans la classification des embryons par le laboratoire de 

Un maximum de 3 embryons est transféré 2 à 3 jours après l'ICSI.

Les embryons surnuméraires y compris les blastocyste sont congelés

Tableau. 2: Classification des embryons

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

Phase lutéale et test de grossesse

-La phase lutéale est soutenue par la progestérone (600mg/jour) juste après la ponction et jusqu'au jour du test de grossesse (après 15 jours).

-Le test de grossesse positif de BHCG correspond à un taux de BHCG égal à 10 UI/L.

-La grossesse clinique été définie par la présence d'un sac gestationnel intra-utérin 3 à 4 semaines après le test de BHCG.



**Chapitre. 2 : DIAGNOSTIC
GENETIQUE DES FORMES TRES
RARES DE TERATOZOOSPERMIE
SEVERE**



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Patients :

Concernant le volet génétique, il s'agit d'une étude prospective concernant les hommes infertiles qui ont des anomalies morphologiques sévères très rares (globozoospermie, macrocéphalie, spermatozoïdes décapités) qui se sont présentés au centre de PMA pour diagnostic d'infertilité.

Cette étude regroupe les données des spermogrammes et spermocytogrammes ainsi que les tentatives d'ICSI des patients infertiles consultant dans le cadre du bilan préparatoire à une procréation médicalement assistée (PMA). La répartition des 404 patients analysés en fonction de leurs spermogrammes et spermocytogrammes montre que l'OAT est l'anomalie la plus fréquente. 26 patients ayant des anomalies morphologiques sévères très rares (globozoospermie, macrocéphalie, spermatozoïdes décapités) ont été sélectionnés pour analyse génétique. Nous avons objectivé 5 cas ayant 100% de globozoospermie avec une infertilité primaire de plus de 5 ans. L'âge moyen de ces patients était de 46.6 ans. 2 souffrent de globozoospermie avec un taux supérieur à 90%. Plusieurs tentatives d'ICSI ont été faites pour ces patients avec des échecs de fécondance sauf pour un patient ayant une globozoospermie partielle 90% et qui a eu une naissance gémellaire dès la première tentative d'ICSI. L'étude génétique a été faite chez 5 patients (G1.G2.G3. G4.G5) avec 100% de spermatozoïdes globocéphales et ayant tous des antécédents familiaux et deux étaient issus de mariage consanguin et une étude d'un cas familial a été faite chez 4 frères infertiles dont 3 (G3.G4.G5) avaient 100% de globozoospermie et un cas normal n'ayant pas cette pathologie, un autre cas familial du 2ème patient (G2) avec 2 frères infertiles a été enregistré mais sans étude génétique des frères.

- 19 patients ayant le syndrome des spermatozoïdes macrocéphales ont été recrutés, l'analyse moléculaire est faite pour 14 patients et 4 parents des patients. L'âge moyen des patients était de 38.5 ans, 3 patients étaient issus de mariages consanguins. L'infertilité était familiale (frères suivis pour infertilité du couple) chez 4 patients. Un nouveau cas a été enregistré pour la première fois ayant 100% de spermatozoïdes décapités.



n :

26 patients ayant une stérilité primaire, et des anomalies morphologiques très rares (globozoospermie, macrocéphalie, spermatozoïdes décapités) et un cas familial du 2ème patient (G2) avec 2 frères infertiles a été enregistré mais sans étude génétique des frères. 5 cas ayant 100% de globozoospermie avec une infertilité primaire de plus de 5 ans. L'âge moyen de ces patients était de 46.6 ans. 2 souffrent de globozoospermie avec un taux supérieur à 90%. Plusieurs tentatives d'ICSI ont été faites pour ces patients avec des échecs de fécondance sauf pour un patient ayant une globozoospermie partielle 90% et qui a eu une naissance gémellaire dès la première tentative d'ICSI. L'étude génétique a été faite chez 5 patients (G1.G2.G3. G4.G5) avec 100% de spermatozoïdes globocéphales et ayant tous des antécédents familiaux et deux étaient issus de mariage consanguin et une étude d'un cas familial a été faite chez 4 frères infertiles dont 3 (G3.G4.G5) avaient 100% de globozoospermie et un cas normal n'ayant pas cette pathologie, un autre cas familial du 2ème patient (G2) avec 2 frères infertiles a été enregistré mais sans étude génétique des frères.

Tout patient répondant au questionnaire établi.

Critères d'exclusion :

Tout patient ayant un spermogramme normal et ne présentant pas de stérilité primaire.

Tout sujet n'ayant pas répondu clairement au questionnaire établi.

Un interrogatoire a été établi pour chaque patient concernant (l'âge, la durée d'infertilité, la profession, les antécédents familiaux et urogénitaux, les habitudes de vie,...) avec une étude de l'arbre généalogique pour la recherche d'une origine génétique. Les principales caractéristiques cliniques de ces patients figurent dans les (Tableaux. 49,50). Chaque patient a été informé du but de l'étude et un consentement a été signé.

Nous avons analysé 100 spermatozoïdes macrocéphales pour chaque patient afin de définir le pourcentage de chaque type morphologique de SM irrégulier (fig. 32 A), régulier (fig. 32B) et à tête multiple (fig. 32C), excepté les patients qui présentent une cryptozoospermie.

Paramètres spermatiques :

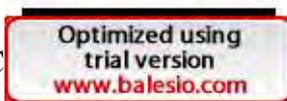
Le recueil du sperme se fait par masturbation après 3 jours d'abstinence, Les spermogrammes ont été réalisés selon les normes de l'OMS 1999 et nous avons utilisé la classification de David et al pour la réalisation des spermocytogrammes (Auger et al., 2000).

Prélèvement du sang

Une quantité de 5 ml de sang total destiné à l'étude moléculaire sont prélevés dans un tube à EDTA vacutainer.

L'extraction de l'ADN

Extraction de l'ADN à partir du sang

-  **leucocytes**
- D: 50 ml ; mettre le sang total (7-10 ml) et compléter à 45ml avec du
TE dans la glace.
- C  00 g (3900 rpm).

- Déverser le surnageant prudemment afin de garder le culot leucocytaire précipité au fond de tube.
- Rajouter le TE 20:5 au culot jusqu'à 25-30 ml, agiter pour le remettre en suspension et laisser 10 min dans la glace.
- Centrifuger dans les conditions précédentes.
- Déverser le surnageant : obtention d'un culot de leucocytes

2- Extraction de l'ADN

- Décongeler les leucocytes.
- Centrifuger pendant 15 min à 3900 rpm
- dilacérer le culot de leucocytes soigneusement afin de les prendre complètement et les mettre dans un tube Falcon conique de 15 ml.
- Ajouter 3 ml de tampon de lyse (Na Cl 400 mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, PH 8.2)
- Ajouter 200 µL de SDS à 10% (100 g SDS + 100 ml H₂O)
- Ajouter 100 µL de protéinase K (PK) à 10 mg / ml.
- dans l'étuve, Agiter le tube sur une roue rotative à 37°C pendant une nuit.
- Le lendemain ; refroidir dans la glace.
- Ajouter 1 ml de Na Cl 4 M et agiter rigoureusement à la main.
- Remettre 5 min dans la glace (précipitation des protéines).
- Centrifuger 15 min à 2500 rpm.
- Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml, ajouter 2 fois son volume d'éthanol 70% préalablement refroidi et agiter en tournant le tube plusieurs fois : la formation d'un culot blanc est visible à l'œil nu. (Laisser éventuellement 30 min à -20°C si la température ambiante est élevée (il ne faut pas)).
- Rincer le culot d'ADN par une pipette pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70% dans un tube nunc (eppendorf) stérile.



3- Solubilisation de l'ADN :

- L'ADN est réhydraté en ajoutant entre 300 et 1000 μL de TE 10 :1 selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.
- Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (de 1 jusqu'à 3 jours).

Extraction d'ADN à partir de salive

La salive du patient est recueillie par crachat dans un kit (DNA Genotek, Ottawa, Canada). On prélève 500 μl de salive auquel on ajoute 20 μl d'Oragene Purifer puis on met dans la glace 10 min avant de centrifuger 5 minutes à 13 000 rpm pour éliminer les déchets qui se retrouvent dans le culot. On récupère donc le surnageant qui contient l'ADN auquel on ajoute de l'Ethanol pour permettre sa précipitation. Il y a alors formation de la pelote d'ADN par retournement du tube. On centrifuge pour que la pelote se colle à la paroi ce qui va nous permettre de la récupérer en éliminant le surnageant. On laisse sécher l'éthanol pour avoir uniquement de l'ADN puis on le reprend dans du TE (10 mM Tris-Cl et 1 mM EDTA). Selon la taille de la pelote, la quantité de tampon ne sera pas la même.

Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN

Nous avons évalué la DO par deux méthodes :

1. spectrophotomètre

L'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines (témoins de contamination) absorbent à 280 nm.

La concentration de l'ADN et sa pureté sont déterminées grâce à la lecture de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre. Les bases puriques et pyrimidiques absorbent

for et à 260 nm, pour cela on effectue une seconde lecture de densité

opt

1-N



stillée dans une cuve pour mesurer le zéro expérimental.

2- Ajouter 10 ul d'ADN dans un tube contenant 990ul d'eau distillée (l'échantillon est dilué au 1/100 dans l'eau distillée). Bien le mélanger (Vortexer) et le transvaser dans une cuve.

3-Après avoir fait le zéro sur la cuve d'eau distillée, mesurer la DO à 260 nm.

4-Fait le zéro une autre fois à 280 nm et mesurer ensuite la DO.

5-Calculer le rapport DO_{260}/DO_{280} pour évaluer la pureté de l'ADN.

On considère que :

L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R=DO_{260}/DO_{280}$ est compris entre 1,6 et 2 ($1,6 < R < 2$)

L'ADN est contaminé par les protéines si : $DO_{260}/DO_{280} < 1,6$

L'ADN est contaminé par les ARN si : $DO_{260}/DO_{280} > 2$

La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Il est donc indispensable de procéder à la réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée.

Les échantillons sont conservés à 4°C pour une utilisation fréquente ou à -80°C pour une longue durée.

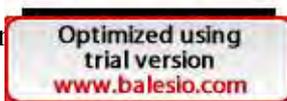
Détermination de la concentration de l'ADN :

Principe :

La densité optique à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que :

-1 unité de DO_{260nm} = 50ug/ml d'ADN double brin

Ex:  Pot dans 1000ul de TE10 :1 ayant une $DO_{260nm}=0.139$

1ul  → 50ug/ml d'ADN

0,139 de DO_{260nm} → X $X=0.139 \times 50=6,95ug/ml$

Considérant que l'ADN est dilué à 1/100, donc $6,95 \times 100 = 695 \text{ug/ml}$. Donc :

La concentration de l'ADN en $\text{ug/ml} = \text{facteur de dilution} \times 260 \times 50 \text{ug/ml}$.

La qualité de l'ADN peut être vérifiée par un contrôle de taille des molécules d'ADN qui doivent être suffisamment longues pour être digérés. L'ADN génomique doit donc être manipulé en évitant toute action mécanique violente.

2. Dosage d'ADN à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop 2000c.

Une fois que l'ADN est extrait, on réalise sa quantification par Nanodrop. C'est un spectrophotomètre qui mesure l'absorbance de l'ADN à 260 nm et à 280 nm. L'absorbance à 260 nm étant proportionnelle à la concentration, on pourra calculer la concentration de la solution d'ADN. Un ratio est calculé : 260/280 qui doit être compris entre 1,8 et 2 pour nous assurer de la pureté de notre ADN. On le diluera ensuite à $50 \text{ng}/\mu\text{l}$.

Détection des mutations

I. Analyses moléculaires

I.1. Amplification par réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) du gène candidat

Principe : Nous avons pour but d'amplifier le gène d'AURORA KINASE C (AURKC) des patients ayant la macrocéphalie en présence des amorces spécifiques pour les 7 exons amplifiés à la recherche d'une mutation au niveau d'un de ces exons.

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) permet l'amplification d'un fragment d'ADN avec l'utilisation d'amorces complémentaires à chacune des extrémités de la séquence d'intérêt. Plusieurs phases existent durant une PCR : la dénaturation qui permet la séparation des deux brins d'ADN, l'hybridation des amorces, l'élongation qui est la synthèse des nouveaux brins pendant plusieurs cycles puis une élongation finale. Etant

doi
pat
pat
25°
am



144delC de l'exon 3 est retrouvée chez une grande majorité de
n par PCR de l'exon 3 est effectuée en premier pour tous les
ns leurs spermocytogrammes un pourcentage de SM supérieur à
mutation c.144delC n'est pas présente à l'état homozygote, une
té des exons du gène AURKC est effectuée afin de rechercher
d'autres variants au sein de ce gène qui peuvent être responsables de la macrocéphalie des

Optimized using
trial version
www.balesio.com

spermatozoïdes. Tous les couples d'amorces qui amplifient les 7 exons du gène AURKC possèdent la même température d'hybridation qui est de 62°C. Les réactifs utilisés lors de la réaction de PCR sont indiqués dans le tableau 3.

Protocole

Préparation de l'échantillon d'ADN

Les échantillons d'ADN extraits sont dilués à une concentration de 50 ng/μl suivant les protocoles et conservés à 4°C le temps de l'étude.

Protocole pour 25 μl final

Manuellement, dans la pièce ADN, sous hotte

Dans un tube stérile ou dans des barrettes ou plaque

- a. Distribuer 1 μl d'ADN à 50 ng/μl /tube
- b. Distribuer 1 μl d'H₂O stérile pour le témoin négatif

Préparation et distribution du mix pré-PCR / Amplification

PCR standard « cold start »

Amplicon AURKC de 179 pb

```
5'GCTTTTTTCTTCCTCTCCTGTCAGGCGGCGCCTCACAGTCGATGACTTTGAAA  
TCGGGCGTCCCCTGGGCAAGGGGAAATTTGGGAATGTGTACCTGGCTCGGCTC  
AAGGAAAGCCATTTTCATTGTGGCCCTGAAGGTTCTTCAAGTCGCAGATAGA  
GAAGGAAGGACTGGAGCACCAGCTGCGCCGGGAAATTGAGATCCAGG 3'
```

Préparation d'un mix pré-PCR en conditions standard : 25 μl de mix contenant en final:



Tableau. 3: Réactifs de la PCR

	Volume
ADN génomique (50ng/μl)	1 μl
Amorce sens (100 pmoles)	0.1 μl
Amorce Anti-sens (100 pmoles)	0.1 μl
Tampon 10X (1,5 mM MgCl ₂)	2.5 μl
dNTP (2 mM)	2.5 μl
Taq polymerase (0,5 U)	0.1 μl
H ₂ O	18,7 μl

(Préparer le mix pour les n + 1 échantillons)

Distribution du mix dans les échantillons d'ADN

- Distribuer 24 μl de mix par point, sous une hotte.

Réaction de polymérisation en chaîne PCR

Programmer les températures et les cycles appropriés sur thermocycleur à 62°C pendant 35 cycles.

En général, condition standard avec Taq QIAGEN :

- Dénaturation initiale 95°C/ 5min
- Dénaturation 94°C/ 30s
- Hybridation (entre 56-60°C) 30s x cycles (entre 30-35)
- Elongation 72°C/ 1min
- Elongation finale 72°C /5 min

Contrôle des amplifiats

Préparation de la solution à déposer (amplifiat + bleu de dépôt) :

- Déposer 2 μl de tampon de dépôt (50 % sucrose / 0.05 % de bleu de bromophénol) dans un tube vide.
- Déposer 2,5 μl d'amplifiat dans le tube contenant 2 μl de tampon de dépôt, et ce pour chaque réaction d'amplification.

Détection électrophorétique

- Déposer 2,5 μl sur gel d'agarose 2 % (2g d'agarose, 5ml TAE, 95 ml d'eau)
- (avec un marqueur de poids moléculaire approprié(s) (2,5ul)
- Faire migrer 130V pendant 25min environ (suivi en fonction du bleu)



- Après migration, prendre une photo du gel sous transillumination aux UV à l'aide de l'imageur Bio-Rad

sur la photo, on valide :

- La taille de l'amplifiat
- L'absence de bandes non spécifiques
- Le témoin négatif

Si notre fragment a été correctement amplifié. Il faudra ensuite le purifier avant de pouvoir procéder à son séquençage.

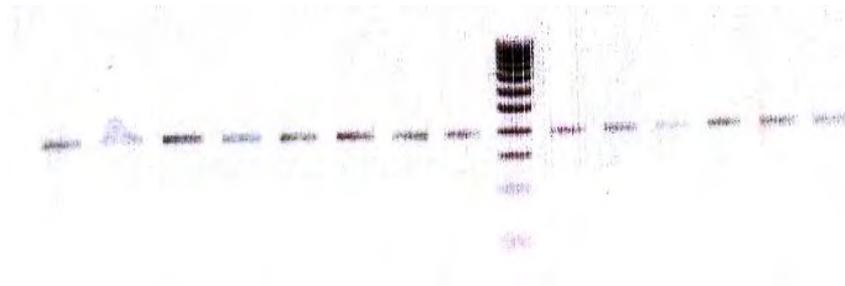


Figure. 16: Profil électrophorétique de l'amplification de l'exon 3 des 14 patients

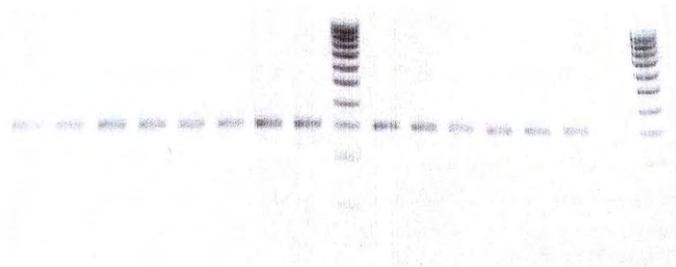


Figure. 17: Profil électrophorétique de l'amplification de l'exon 6 des 14 patients

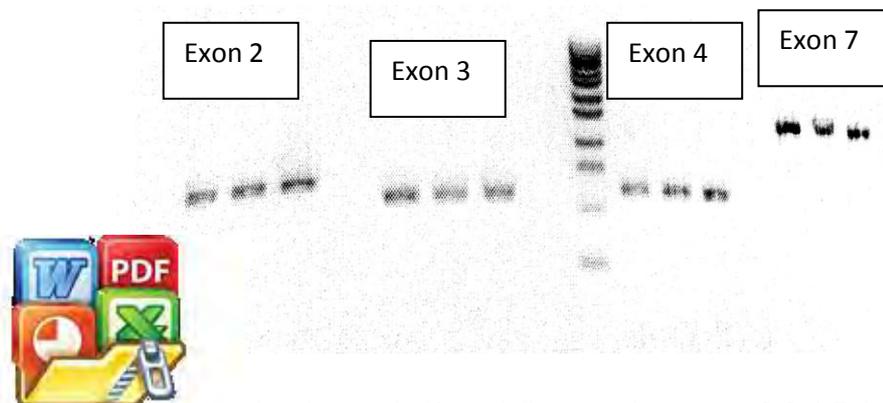


Fig phorétique de l'amplification des exons 2.3.4.7 des 3 patients

Optimized using
trial version
www.balesio.com

Avant d'effectuer un séquençage par la méthode de Sanger sur les produits amplifiés, des étapes de purification de ces produits et de préparation au séquençage sont nécessaires. Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant le kit BigDye Terminator v3.1.

1) Purification

L'étape de purification des produits d'amplification est nécessaire car elle va permettre l'élimination des amorces et des dNTPs en excès dans les produits amplifiés. Il existe plusieurs méthodes de purifications et la méthode utilisée dans notre laboratoire est la purification enzymatique en utilisant la solution ExoSAP. Afin d'effectuer cette purification il faut prélever un volume de 5µl d'amplifiat auquel il faut rajouter 1µl d'ExoSAP.

L'ExoSAP contient deux enzymes thermolabiles : l'Exonucléase I qui dégrade les ADN simples brins et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui hydrolyse les dNTPs libres. L'enzyme est activé à 37°C et inactivé à 80°C.

2) Réaction de séquence

On réalise une réaction de séquence sur nos amplifiats qui consiste à l'ajout d'un Mix qui contient les réactifs nécessaires qui sont les ddNTPs(didésoxyribonucléotides), les dNTPs, la polymérase puis une seule amorce complémentaire à une extrémité de notre séquence. Deux réactions de séquence avec une amorce différente (Reverse et Forward) sont réalisées.

Un coffret contenant le mélange ou « Mix » est déjà prêt à l'emploi. Il s'agit du Mix de séquence (Big dye-Terminator cycle sequencing Ready Reaction Kit) fourni par Applied BioSystem. Une réaction de séquence est réalisée sur les amplifiats par l'ajout de ce mix et des réactifs suivants : les désoxyribonucléotides (dNTPs) les didésoxyribonucléotides (ddNTPs), MgCl₂, un tampon Tris HCL pH=9 et l'Ampli Taq pol.

4.



Tableau. 4: Volumes des réactifs utilisés pour une réaction de séquence

Produit	Volume
Mix BigDye/tampon	2,25 μ L
Amorce	1,6 μ L à 2pmol/ μ L
Amplifiat	1 μ L
Eau	5.1ul
Volume final	9.95ul

Après l'ajout des différents réactifs, la réaction de séquence est réalisée dans un thermocycleur pendant 2h selon le programme suivant : Une 1^{ère} étape de dénaturation de l'ADN à 96°C pendant 1 minute et une étape de dénaturation de l'ADN à 96°C pendant dix secondes suivie d'une étape d'hybridation de l'amorce sur le brin matrice à 50°C. Enfin l'élongation du brin d'ADN est stoppée par l'incorporation du ddNTP marqué par un fluorochrome. On aura ainsi tous les fragments d'ADN qui diffèrent d'un seul nucléotide. Ce programme sera réalisé pendant 25 cycles.

Principe :

Les techniques de séquençage utilisent des oligonucléotides particuliers : les didésoxyribonucléotides (ddNTP). Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH bien précis (Figure. 19). En effet, lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.



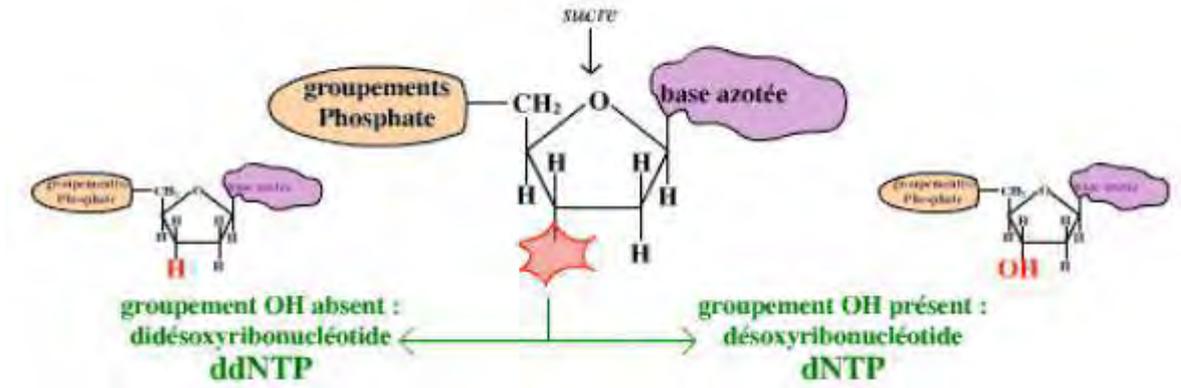


Figure. 19 : Schéma des deux types de nucléotides triphosphates

1. Purification des produits de la réaction de séquence

La purification est une étape qui sert à éliminer les excès de Mix et d'amorces utilisés précédemment pour la réaction de séquence. Celle-ci se fait en plusieurs étapes :

Centrifuger brièvement les barrettes ou la plaque 96 puits avant purification

- diluer l'EDTA 0,5M à 125mM dans de l'eau milliQ
- Préparer extemporanément un mélange contenant par point :
- 1 µl d'EDTA 125 mM
- 1 µl d'acétate de Na 3M
- puis 50 µl d'Ethanol 100%

Il est important d'ajouter l'éthanol après l'EDTA et l'acétate de Na (le mélange devient blanc), agiter doucement par inversion manuelle 2 à 3 fois (le mélange reste blanc mais ne doit pas précipiter)

- Ajouter 52 µl du mélange dans chaque puits
- Fermer les barrettes ou la plaque 96 puits et mélanger par inversion vigoureuse 4 fois
- Centrifuger brièvement

- Incuber 15 minutes à température ambiante

- Placer la plaque 96 puits dans un portoir adapté et centrifuger 45 minutes à 200 g

- Ejecter les barrettes ou de la plaque 96 puits, retourner le portoir sur plus de 15 minutes à 180 g. Placer le portoir dans un boîtier absorbant et centrifuger à 180 g 30 secondes à partir de la vitesse de centrifugation précédente.

- Ajouter 70 µl d'Ethanol 70%, laissé à température ambiante 30 min auparavant



- Reboucher les barrettes ou la plaque 96 puits et vortexer
- Centrifuger à 1650g pendant 15 minutes à 4°C
- Enlever les bouchons des barrettes ou de la plaque 96 puits, retourner le portoir sur plusieurs feuilles de papier absorbant et centrifuger à 180g 30 secondes à partir de la vitesse atteinte.
- Renouveler le lavage à l'éthanol 70%
- Laisser sécher à température ambiante environ 10-15 minutes : lorsque les culots sont secs, il est possible de conserver à -20°C les réactions de séquence purifiées (1 mois)

Préparation des échantillons

- Reprendre par 15 µl de Hi-Di formamide les réactions de séquences purifiées et séchées : vortexer jusqu'à redissolution du culot (environ 2 minutes).
- Transférer les barrettes sur une MicroAmp 96-well reaction plate pour séquençage
- Préparer un plan de plaque sur papier et nommer le run : SEQ00x_x

2. L'étape du séquençage

Le séquençage des produits purifiés est effectué par le séquenceur ABI 3130XL seize capillaires. Les réactions de séquences seront chargées sur ces différents capillaires qui seront plongés dans des tampons de migration où une électrophorèse sera effectuée. Ceci permettra la lecture des ddNTPs qui sont incorporées à la fin des fragments d'ADN. Les petits fragments migreront plus vite que les gros. Chacun de ddNTP (A,T,C,G) est marqué d'un fluorophore différent. Cela permettra une lecture de notre séquence sur électrophérogramme.

Diagnostic de la globozoospermie et recherche de la délétion DPY19L2

Technique MLPA

Pour cette étude, trois sondes MLPA synthétiques spécifiques aux exons 1, 17 et 22 de DPY19L2 et les autres paralogues et pseudogènes DPY19L, ont été conçus afin de correspondre à DPY19L2 décalages spécifiques du site de ligature (Schouten et al., 2002). En outre, les trois sondes spécifiques au gène OCRL1 ont été inclus pour servir de sondes de contrôle pour la quantification du nombre de copies. Des informations sur les séquences et



les sites de ligature de ces sondes de contrôle peuvent être obtenus en (Coutton et al., 2012). La hauteur comparée des sondes de contrôle avec des sondes cibles autorise l'accès au nombre de copies cibles présentes dans l'ADN de l'échantillon.

Technique :

Après mesure de la DO

Pour MLPA on dilue à 30 ng/ul (On prend 1ul d'ADN)

1/-Dénaturation

On met 5 ul d'ADN (30ng) dans les tubes MLPA

Dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, 25°C pour réchauffer

2/- Hybridation

Préparation du Mix :

On a deux produits :

Salsa prob mix : 1.5ul x X (nombre de réactions)

Salsa MLPA Buffer (tampon) : 1.5 x X

Les sondes vont s'hybrider avec nos amplifiants

-Ajouter 3ul de mix /tube

-Skip Step-ok (95°C pendant 1 minute/ 60°C pendant 16h)

3/-Elongation

Mix 2 : ligase-65 buffer A et B (Décongeler et vortexer)

Lig

Lig

H₂O

Lig



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Ajouter 32ul de Mix 2/tube + flusher

Skip Step-OK à 54°C pendant 15 minutes / 98°C à 5 minutes (inactivation de la ligase)

PCR

Mix 3 : - Salsa PCR primer Fam mix (marqueur fluorescent) 2 ul x X

H₂O 7.5 ul x X

-Salsa polymérase 0.5ul x X

-On met 10 ul de mix 3 + flusher

-Skip-Step – ok

PCR normale : 25 cycles (95°C - 30 secondes / 60°C -30 secondes / 72°C -60 secondes)

-Elongation 72°C -20 minutes / 15°C

-La séquence de l'amorce universelle « sens » marquée en 3' avec le 6-carboxyfluorescéine (FAM) est 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3' et celle de l'amorce « anti sens » non marquée est 5'-GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3'

-Un volume de 1 ul d'amplifiats est mélangé à 10 ul de formamide et 0.5 ul de marqueur de taille puis chauffé 2 minutes à 95°C et brutalement refroidi dans la glace. Ce mélange sera ensuite analysé par électrophorèse capillaire, réalisée sur un automate de séquençage.

Technique de comparaison (PCR duplex et PCR des exons 11,22) avec MLPA

PCR longue duplex 2000 pb

Amorces : DPY ; CFW 1b et TRv1 ; RYR 1 : F RYR1 ex40 et R RYR1 ex42

Tampon, dNTPs et enzyme LA TAKARA

Prc : 35x60 Takara (2'30 élongation) Thermocycler Applied Verity

(bl

-Pr



Tableau. 5: Produits PCR duplex

Produits	Volume
Tampon	2.5 ul/pt
Glycérol	2.5ul/pt
dNTPS	3ul/pt
F RYR1 ex 40(10uM)	0.25ul/pt
R RYR1 ex 42(10uM)	0.25ul/pt
CFW1b DPY (10uM)	1ul/pt
TRv1 DRY (10uM)	1ul/pt
Taq 0.2ul/pt	0.2ul/pt
H ₂ O	12.3ul/pt

Préparer gel agarose 1.5% et LF ladder

Bande RYR1 à 1000 pb. Bande DPY à 2000pb.

Faire simultanément PCR exon 11 et 22 DPY

Programme thermocycler classique 35x58

Enzyme Qiagen

Mix classique (glycérol possible)

Si l'analyse de la bande DPY (2000pb), positive pour bande RYR1 (1000pb) et PCR
 2 (€)  e : pas de délétion de DPY19L2.

Si l'analyse de la bande DPY (2000pb), positive pour bande RYR1 (1000pb) et PCR
 2 (€)  : recherche délétion par MLPA.

Si PCR 1 positive pour bande DPY (2000pb), positive pour bande RYR1 (1000pb) et PCR (exon 11 et 22) négative : délétion homozygote de DPY19L2.

Si PCR 1 positive pour bande DPY (2000pb), positive pour bande RYR1 (1000pb) et PCR2 (exons 11 et 22) positive : délétion hétérozygote de DPY19L2. Indications de séquençage de DPY19L2.

Si PCR 1 négative pour bande DPY (2000pb), négative pour bande RYR1 (1000pb) et PCR2 (exons 11 et 22) positive/négative : échec. Refaire manipulation.



TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Description de la population d'étude

Notre étude épidémiologique a porté sur un échantillon de 404 patients ayant un spermogramme et spermocytogramme pathologiques et destinés pour faire une ICSI. Sur les 599 patients consultant au niveau du centre de PMA, 499 ont présenté des anomalies cytospermiologiques soit 83.3%, alors que les spermogrammes/ spermocytogrammes reviennent normaux dans 100 cas soit 16.7%. Les spermogrammes et spermocytogrammes pathologiques étudiés représentent 67.4% de la population pathologique étudiée (tableau. 6).

Tableau. 6 : Résultats globaux des données des spermogrammes et spermocytogrammes

Résultats	Effectifs	Pourcentages (%)
Spermogrammes/spermocytogrammes pathologiques	499	83.3
Spermogrammes/spermocytogrammes normaux	100	16.7
Total	599	100

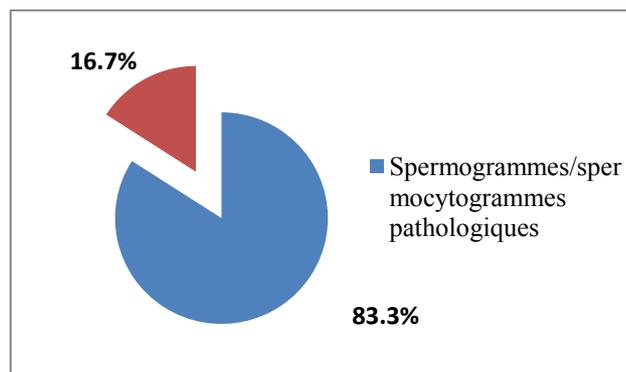


Figure.20 : Répartition des patients en fonction de la normalité ou la pathogénicité des résultats du spermogramme et spermocytogramme.

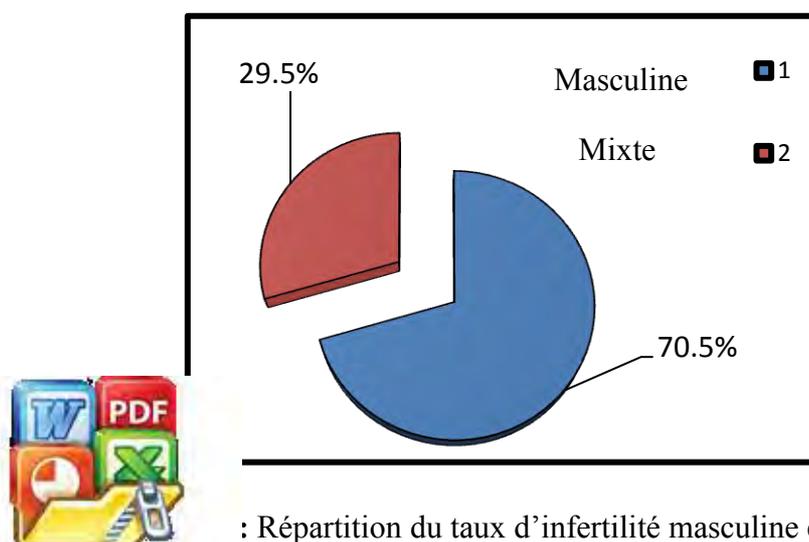


Tableau. 7 : Fréquence des spermogrammes et spermocytogrammes pathologiques étudiés par rapport à la totalité des spermogrammes et spermocytogrammes pathologiques

Résultat	Effectifs	Pourcentage (%)
Spermogrammes et spermocytogrammes pathologiques étudiés	404	67.44
Spermogrammes et spermocytogrammes normaux	100	16.69
Spermogrammes et spermocytogrammes pathologiques exclus	95	15.85
Total	599	100

Fréquence des spermogrammes et spermocytogrammes pathologiques

Sur 599 dossiers inclus au niveau du centre de la PMA pour infertilité, la fréquence des patients ayant un spermogramme et/ou un spermocytogramme pathologique était de 83.3%. Parmi les couples consultant pour infertilité, une indication féminine seule était présente chez 16.7% des couples. Parmi les 404 patients retenus dans notre série, 70.5% présentent une indication masculine seule et 29.5% présentent une indication mixte masculine et féminine (figure. 21).



: Répartition du taux d'infertilité masculine et mixte

Sur le plan clinique

L'infertilité était primaire dans 90.3% (n= 365) et secondaire dans 9.7% (n= 39) avec une durée moyenne de $6,7 \pm 3,6$ ans et des extrêmes d'un an et 20 ans, avec 42,8 % des patients présentant une infertilité de 1-5 ans et 45,3% de 6-10 ans (tableau. 8,9).

Tableau. 8: Répartition des cas pathologiques selon le degré d'infertilité

Type d'infertilité	Effectifs	Pourcentage (%)
Primaire	365	90.3
Secondaire	39	9.6
Total	404	100

Tableau. 9 : Répartition des cas en fonction de la durée d'infertilité

Durée	Effectifs	Pourcentage (%)
1-5	173	42.8
6-10	183	45.3
11-15	37	9.1
16-20	11	2.7
Total	404	100

Sur le plan biologique

Concernant le bilan spermatique, le spermogramme était perturbé dans 83,3% des cas. Parmi ces patients, une oligo-asthéo-téatospermie (OAT) a été objectivée dans 19 cas (20.5%), une AT pour 79 cas (11.4%), une AT et asthénospermie (A) chez 83 patients (20.5%), une AT pour 79 cas (11.4%) est notée chez 46 cas (11.4%). La biopsie a été réalisée dans la plupart des cas (19 cas) et a permis de confirmer une oligospermie, une oligospermie (O) pour 41 cas (10.1%) (avec une oligozoospermie sévère (OS) pour 27 cas et oligospermie modérée (OM) pour 14 cas) ainsi



une oligo-asthénospermie (OA) pour 35 cas (8.4%) (Tableau. 10). Enfin 16 cas (4%) présentaient des anomalies de volume (groupe HPOR) avec 13 cas d'hypospermie (HPO) et 3 cas d'hyperspermie (HPR), tandis que chez 100 patients (16,4%) le spermogramme était normal.

Tableau. 10: Répartition de la fréquence des cas pathologiques

Diagnostic	Fréquence	Pourcentage(%)
Oligo-asthénospermie	104	25,7
Asthénospermie	83	20,5
Asthéno-tératospermie	79	19,6
Azoospermie	46	11,4
Oligospermie	41	10.14
Oligo-asthénospermie	35	8.66
Hyperspermie et hypospermie	16	4
Total	404	100

A : asthénospermie / OAT : oligo-asthénospermie/ AT : asthénospermie/ O : oligospermie/ OA : oligo-asthénospermie/ Azoo : azoospermie/ HPOR : Hypospermie+Hyperspermie

Répartition de types d'infertilités selon les pathologies

La répartition des types d'infertilités selon la pathologie, consignée dans le tableau. 11, spermie, l'asthénospermie et l'asthénospermie semblent être de l'infertilité primaire avec respectivement 94, 73 et 70 cas sur 365 l'azoospermie (41 cas), l'oligospermie (40 cas) l'oligo-asthénospermie (35 cas) et l'hypospermie et l'hyperspermie (13 cas). Concernant l'infertilité secondaire, l'oligo-asthénospermie, l'asthénospermie et l'asthénospermie apparaissent comme étant les premières causes avec une fréquence de 10, 10

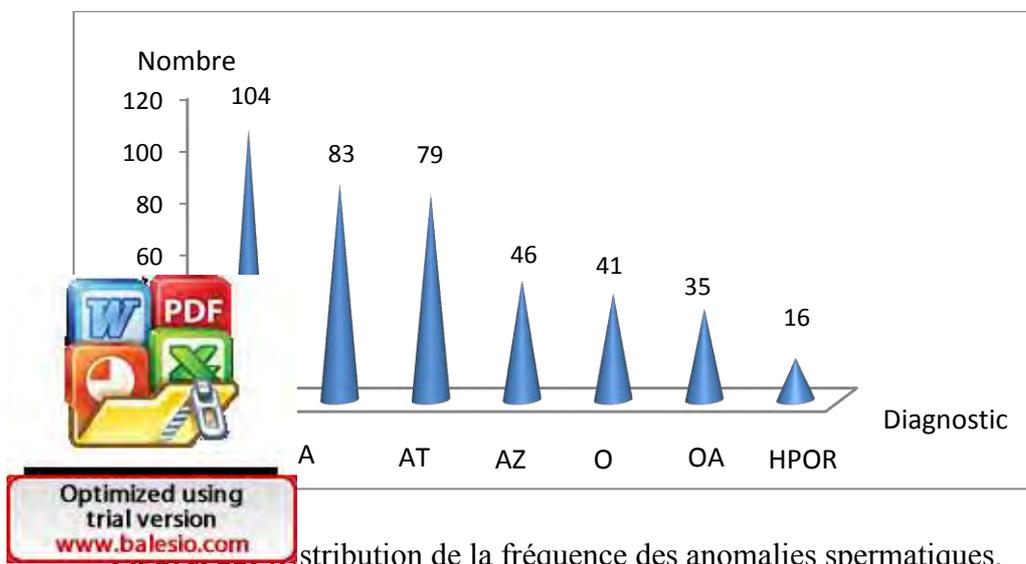


Optimized using trial version
www.balesio.com

et 9 cas respectivement sur les 39 patients recensés (tableau. 11). Nous n'avons trouvé aucune différence significative entre le diagnostic et le type d'infertilité $p < 0.05$.

Tableau. 11 : Répartition des deux types d'infertilité selon les pathologies.

	Infertilité primaire		Infertilité secondaire			
	Fréquence	%	Fréquence	%	Total	%
Asthénospermie	73	20	10	25.6	83	20.5
Asthéno-tératospermie	70	19.2	9	23.1	79	19.6
Azoospermie	41	11.2	5	12.8	46	11.4
Hyperspermie et hypospermie	13	3.5	3	7.7	16	3.9
Oligospermie	40	11	1	2.6	41	10.1
Oligo-asthénospermie	34	9.3	1	2.6	35	8.7
Oligo-asthénotératospermie	94	25.8	10	25.6	104	25.7
Total	365	100	39	100	404	100



Distribution de la fréquence des anomalies spermatisques.

Répartition des cas en fonction du lieu d'habitat :

Selon les régions géographiques la wilaya de Constantine représente le pourcentage le plus élevé des patients consultant pour une infertilité masculine avec près de 99 cas soit 24.5 %, suivi par la wilaya de Batna avec 51 cas (12.6%) et la wilaya de Sétif avec 38 cas (9.4%) (tableau.12).

Tableau. 12 : Répartition des cas en fonction du lieu d'habitat

Région	Effectifs	Pourcentages(%)
Alger	5	1.2
Annaba	11	2.7
Batna	51	12.6
Borj bouaririj	11	2.7
Bejaia	7	1.7
Biskra	20	4.9
Constantine	99	24.5
El oued	4	1
Guelma	8	2
Jijel	31	7.6
Kalla	2	0.5
Khenchla	27	6.6
Mila	28	6.9
M'sila	5	1.2
Oum bouaghi	33	8.1
Souk ahrass	2	0.5
Sétif	38	9.4
Skikda	11	2.7
sa	4	1
es	7	1.7
l	404	100



Répartition des cas en fonction des différents facteurs de risque

Age

L'âge moyen des patients était de 38 ± 5.6 ans, avec des extrêmes de 26 et 55 ans, la tranche d'âge comprise entre 36 et 40 ans est la plus fournie avec 153 patients (37.9%) suivie par celle de 31 à 35 ans avec 98 cas (24.3%) (Figure. 23). L'âge moyen des épouses était de 32.6 ± 4.96 ans avec des extrêmes de 18 et 46 ans.

Tableau. 13: Répartition des patients en fonction de l'âge

Classe d'âge	Fréquence	Pourcentage(%)
26-30	21	5.2
31-35	98	24.3
36-40	153	37.9
41-45	77	19
46-50	40	9.9
51-55	15	3.7
Total	404	100

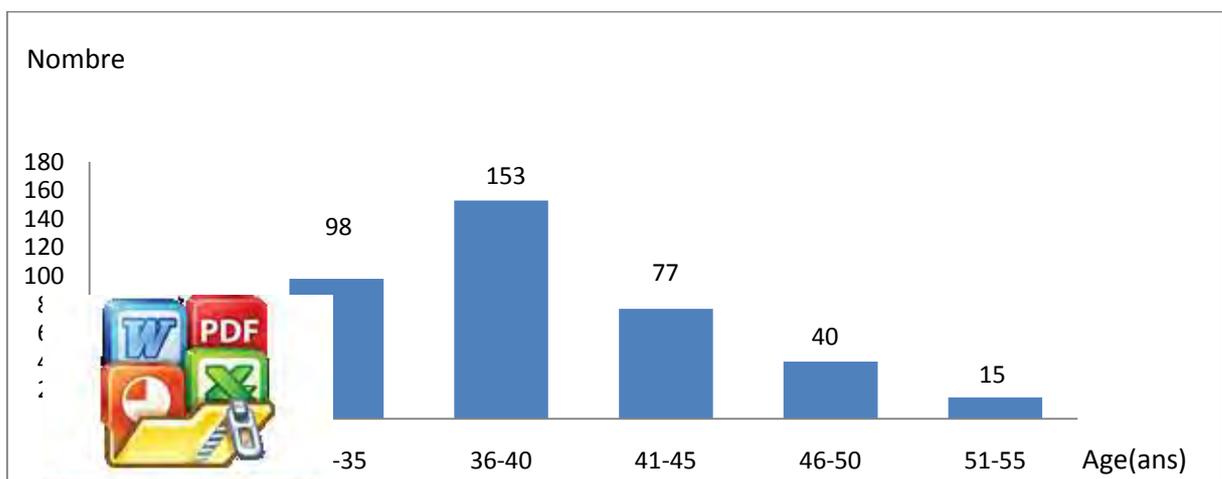
Relation entre le type d'infertilité et les tranches d'âge des patients

Les résultats liés à l'âge de la population étudiée indiquent que les patients les plus touchés par l'infertilité primaire se situent dans la tranche d'âge de 36-40 ans avec 39.7%, tandis que ceux de l'infertilité secondaire sont de 41-45 ans avec 35.9 % des cas. Le pourcentage des patients âgés plus de 50 ans représentent 13.6 % des cas étudiés. Globalement le taux d'infertilité primaire est significativement plus élevée entre 26-40 ans ($p < 0.001$) par rapport à la tranche d'âge de 41-55ans. L'infertilité secondaire étant significativement plus élevée entre 41-55 ans ($p < 0.05$) (tableau. 14).



Tableau. 14: Répartition des patients en fonction de l'âge

Type d'infertilité Tranches d'âge	Infertilité primaire		Infertilité secondaire		Total	%
	Fréquence	%	Fréquence	%		
26-30	21	5.8	0	0	21	5.2
31-35	94	25.8	4	10.3	98	24.3
36-40	145	39.7	8	20.5	153	37.9
41-45	63	17.3	14	35.9	77	19
46-50	33	9	7	17.9	40	9.9
51-55	9	2.5	6	15.4	15	3.7
Total	365	100	39	100	404	100



Distribution des fréquences d'âges de la population étudiée

Age moyen = 38.89 ± 5.65 ans, calculé sur l'ensemble de l'échantillon (m+SD)

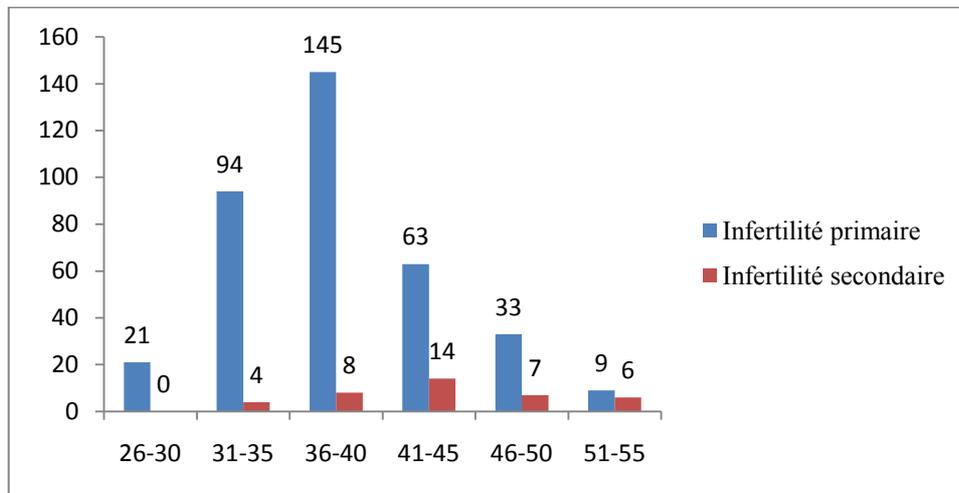


Figure. 24: Répartition des deux types d'infertilité en fonction de l'âge

Profession

Les patients recrutés ont été divisés en 7 groupes socio-professionnels (tableau.15). Le groupe le plus représenté était le groupe des fonctionnaires avec 27.7% (n=108), suivis du groupe des militaires (68 cas) et agents de sécurités (17cas) avec 21.03 %, suivis du groupe des commerçants (70 cas) avec 17.3%.



Tableau. 15: Répartition des cas selon la profession

Profession	Effectifs	Pourcentage(%)
Fonctionnaire	108	26.7
Militaire et agent de sécurité	85	21.03
Commerçant	70	17.3
Libérale	58	14.35
Chauffeur	31	7.7
Ouvrier	21	5.2
Sans profession	13	3.2
Cuisinier	9	2.2
Agriculteur	9	2.2
Total	404	100

Groupe 1 : cuisinier et chauffeur / **Groupe2 :** agriculteur/ **Groupe3 :** ouvrier /**Groupe 4:** agent de sécurité, les militaire / **Groupe5 :** libérale / **Groupes 6 :** commerçant / **Groupes 7 :** fonctionnaire.

L'activité physique

217 sujets soit (53.7%) ne pratiquent pas d'activité sportive contre 108 soit 26.7% des patients qui font du sport régulièrement (≥ 2 fois par semaine), 8.2% le pratiquent rarement et 11.4% l'ont arrêté (tableau. 16).



Tableau. 16 : Répartition des cas selon l'activité physique

Activité physique	Fréquence	Pourcentage (%)
Pas d'activité	217	53.7
Activité régulière	108	26.7
Arrêt d'activité	46	11.4
Rarement	33	8.2
Total	404	100

Les bains chauds

36,9% des patients ont indiqués prendre régulièrement des bains chauds contre 63.1% qui en prennent rarement ou jamais (tableau. 17).

Tableau. 17: Répartition des cas en fonction des bains chauds

Les bains chauds	Effectifs	Pourcentage (%)
Non	238	63.1
Oui	139	36.9
Total	377	100

Répartition des cas selon l'exposition professionnelle

Nos résultats montrent que parmi les facteurs qui peuvent influencer la fertilité la chaleur représente le pourcentage le plus élevé avec 11.3% et des taux moins importants pour les agents toxiques et radiations (tableau. 18).



Optimized using trial version www.balesio.com

Tableau. 18 : Distribution des cas en fonction de l'exposition professionnelle

Exposition professionnelle	Effectifs	Pourcentage(%)
Pas de risque	345	85.4
Chaleur	46	11.4
Agents toxiques	10	2.4
Radiations	3	0.7
Total	404	100

Les habitudes de vie toxiques :

a. Statut tabagique des patients

S'agissant des comportements à risque, parmi les cas étudiés, 210 cas (52%) ne fument pas contre 175 cas (43.31%) qui sont des fumeurs. Sur un total de 130 fumeurs, 90 patients soit 69.2% consomment plus de 20 cigarettes par jour (c/j) contre 40 patients (30.8%) qui consomment moins de 20 cigarettes par jour (tableaux. 19 et 20).

Tableau. 19: Répartition des cas en fonction du statut tabagique

Statut tabagique	Infertilité primaire		Infertilité secondaire			
	Fréquence	%	fréquence	%	Total	%
Fumeurs	161	44.1	14	35.9	175	43.3
Non fumeurs	192	52.6	18	46.2	210	52
non mentionnés	12	3.3	7	17.9	19	4.7
	365	100	39	100	404	100



Tableau. 20: Répartition des fumeurs en fonction de la moyenne de cigarettes /jour

Moyenne de cigarettes par jour	Effectifs	Pourcentage(%)
>20 cigarettes	90	69.2
<20 cigarettes	40	30.8
Total	130	100

Consommation d'alcool

Le tableau. 21 montre que 87.6% des cas n'ont jamais consommé d'alcool contre 8.5% qui l'ont fait.

Tableau. 21: Répartition des cas en fonction de la consommation d'alcool

ALCOOL	Infertilité primaire		Infertilité secondaire			
	Effectifs	%	Effectifs	%	Total	%
Alcooliques	31	8.5	3	7.7	34	8.4
Non alcooliques	322	88.2	32	82.1	354	87.6
Non mentionné	12	3.3	4	10.3	16	4
Total	365	100	39	100	404	100

Consommation de la cigarette et d'alcool ensemble

Le tableau 22 montre que 53,7% des patients sont des non fumeurs et non alcooliques. 8.7% sont des fumeurs non alcooliques. 8.7% sont des fumeurs alcooliques.

alc:

alc:



Tableau. 22 : Répartition des cas en fonction des habitudes de vie toxiques

Tabac et alcool	Effectifs	Pourcentage(%)
Non fumeur et non alcoolique	217	53,7
Fumeur non alcoolique	130	32,2
Fumeur et alcoolique	35	8,7
Non mentionnée	19	4,7
Non fumeur et alcoolique	3	0,7
Total	404	100

Antécédents :

Le tableau. 23 montre une prédominance des antécédents familiaux chez les patients infertiles avec 93 cas soit 23 % suivi des antécédents urogénitaux avec 71 cas soit 17.6 % et des antécédents médicaux avec 36 cas soit 8.9% ainsi que 23 cas ayant des antécédents urogénitaux et familiaux soit 5.7%, alors que 181 cas n'ont aucun antécédents soit 44.8%.

Tableau. 23 : Répartition des cas en fonction des antécédents

Antécédents	Effectifs	Pourcentage(%)
Sans antécédents	181	44.8
Familiaux	93	23
Urogénitaux	71	17.6
Médicaux	36	8.9
Urogénitaux et familiaux	23	5.7
Total	404	100

An

Le ... la plus représentée avec 5.2% (n=21 cas) suivis des maladies res... ques avec 2.5% (n=10 cas), des maladies cardiovasculaires avec



1.7 % (n=7 cas), 1.5% des cas ayant des maladies métaboliques alors que 86.6% des cas n'ayant pas d'antécédents médicaux (tableau. 24).

Tableau. 24 : Infertilité et antécédents médicaux

Antécédents médicaux	Effectifs	Pourcentage(%)
Sans antécédents	350	86.6
Diabète	21	5.2
Maladies respiratoire	10	2.5
Maladies neurologiques	10	2.5
Maladies cardiovasculaires	7	1.7
Maladies métaboliques	6	1.5
Total	404	100

Antécédents urogénitaux

Sur les 404 patients, que nous avons recensé au cours de cette étude, 320 patients soit 79.2%, ne présentent pas d'antécédents urogénitaux. Par contre pour le reste de la population, 84 soit 20.8% ont des antécédents urogénitaux, dont nous avons noté une prédominance de varicocèle avec 64 cas (15.8%), suivis des antécédents de problèmes testiculaires avec 14 cas (3.5%) ainsi que l'hernie inguinale avec 6 cas (1.5%). La varicocèle est associée avec l'OAT dans 19 cas soit 29.7%, l'AT dans 17 cas soit 26.6% et l'A dans 10 cas soit 15.6% (tableau. 25).



Tableau. 25: Distribution des patients selon les antécédents urogénitaux

Antécédents urogénitaux	Fréquence	Pourcentage (%)
Sans antécédents	320	79.2
Varicocèle	64	15.8
Problème testiculaire	14	3.5
Hernie inguinale	6	1.5
Total	404	100

Antécédents familiaux

Parmi les 404 cas, 281 cas soit 69.6 % n’ayant aucun antécédent familial, 123 cas (30.4%) ont indiqué avoir des antécédents familiaux d’infertilité. Parmi les 123 cas, nous avons noté un pourcentage élevé des antécédents d’infertilité de fratrie avec 62 cas (15.3 %) suivi des antécédents de la famille avec 43 cas (10.6%) ainsi que 18 cas ayant des antécédents de fratrie et famille (4.5%) (tableau. 26). La notion de consanguinité des parents est apparue chez 33.9 % des patients ayant des antécédents de fratrie, 33.3% des patients ayant des antécédents de famille et fratrie ensemble et 7% des patients ayant des antécédents de famille (figure. 25).

Tableau. 26 : Répartition des cas en fonction des antécédents familiaux

Antécédents familiaux	Effectifs	Pourcentage(%)
Sans antécédents	281	69.6
Fratrie	62	15.3
Famille	43	10.6
Fratrie et famille	18	4.5
Total	404	100



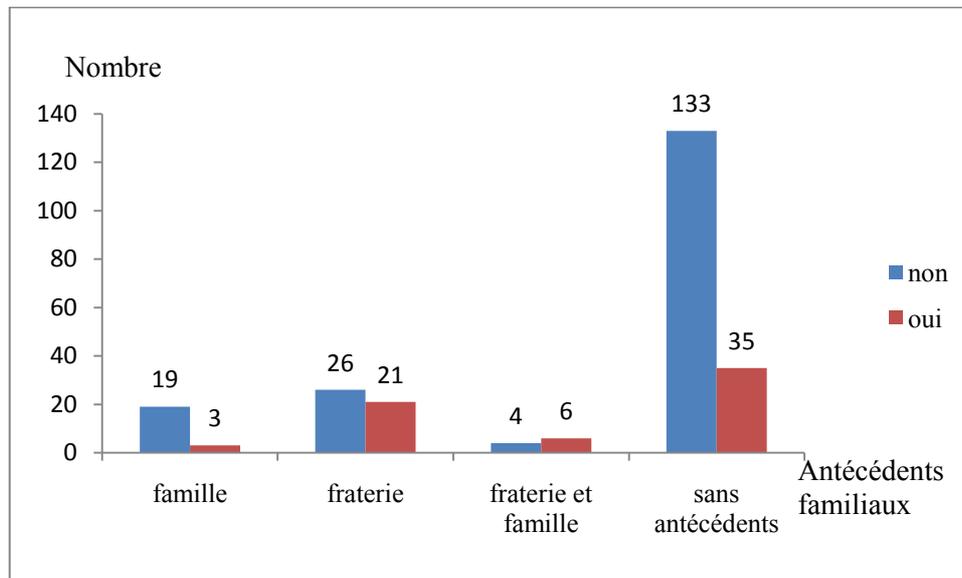
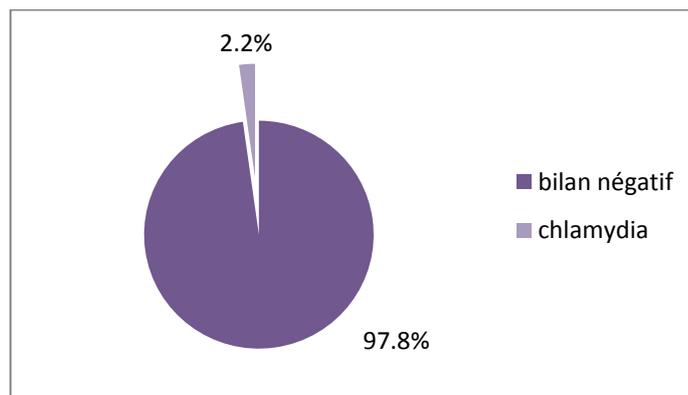


Figure. 25: Répartition des antécédents familiaux en fonction de la consanguinité des parents

Maladies sexuellement transmissibles

La figure. 26 montre que 395 cas soit 97.8% ayant un bilan infectieux négatifs alors que 9 cas soit 2.2% ayant une maladie sexuellement transmissible qui est chlamydia.



leu

rtition des cas en fonction des résultats du bilan infectieux

teurs de risques comportementaux et environnementaux et
ramètres spermatiques



Tests de dépendance entre les différents paramètres de l'étude :

Le test du khi-carré

Pour vérifier l'indépendance de deux ou plusieurs caractères qualitatifs, on utilise le test statistique χ^2 de PEARSON. Le principe du test consiste à calculer une quantité observée appelée χ^2_{obs} et la comparer à une quantité théorique pour un niveau de $\alpha = 0.05$ significatif et pour un certain degré de liberté dl .

La corrélation de Pearson

La corrélation de Pearson est un test d'association entre deux variables aléatoires, continues et normalement distribuées.

Elle est représentée par la lettre r , et son score varie entre +1 et -1. Plus le r se rapproche de +1 ou -1, plus l'association entre les deux variables est forte. Plus il se rapproche de 0, moins elle l'est. Le signe indique le sens de la relation.

Une association très forte entre deux variables produira un nuage de points très rapprochés sur un graphique. À la limite, lorsque l'association est parfaite (+1 ou -1), tous les points s'alignent pour former une droite.

Distribution des pathologies selon l'âge

La distribution des pathologies selon l'âge des patients montre que toutes les tranches d'âge sont touchées par des perturbations spermiologiques, mais elles sont plus accentuées dans la tranche d'âge 36-40 ans avec une fréquence de 153 cas sur 404 patients étudiés soit un taux de 37.8%, cette tranche d'âge est la plus touchée de l'OAT avec une fréquence de 45 cas suivis de l'asthéo-tératospermie et l'asthénospermie avec respectivement 34 et 30 cas sur les 153 cas rencontrés.

La tranche d'âge 31-35 ans représente une fréquence relativement élevée, elle est de l'ordre de 24,25 %. Les anomalies spermatiques suspectées sont principalement l'oligo-asthéo-tératospermie (24 cas/98), l'asthénospermie (19 cas/89) et l'asthéo-tératospermie

(19

Les pat

30

ent



Optimized using
trial version
www.balesio.com

moins affectées sont les jeunes âgés de moins de 30 ans et les 30-40 ans avec des taux respectifs de 5.2% pour la tranche d'âge 26-30 ans et 5.2% pour la tranche d'âge 31-35 ans. Il n'existe aucune liaison statistique significative entre le spermogramme $KHI_2 = 32.76$ et $P = 0.33$.

Tableau. 27 : Relation entre les tranches d'âge et le résultat du spermogramme.

Tranches d'âge Résultat du spermogramme	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	TOTAL
Asthénospermie	2	19	30	18	11	3	83
Asthénotératospermie	3	19	34	13	7	3	79
azoospermie	6	16	15	7	1	1	46
hypospermie et hyperspermie	0	1	6	7	2	0	16
oligozoospermie	2	11	13	8	6	1	41
Oligo-asthénozoospermie	3	8	10	10	3	1	35
Oligo-asthénotératospermie	5	24	45	14	10	6	104
TOTAL	21	98	153	77	40	15	404

Evolution des paramètres spermatiques en fonction de l'âge

Coefficient de corrélation :


 Néanmoins, le spermogramme est réparti en 6 classes d'âges de 5ans. Le calcul de coefficients de corrélation entre les différentes caractéristiques du spermogramme d'un coté et entre ces paramètres et l'âge d'un autre coté a été effectué pour l'échantillon des patients ayant des paramètres spermatiques complètes (spermogrammes et spermocytogrammes) (227 patients) tout âge confondu puis pour les différentes classes d'âge séparément.

La recherche d'une corrélation entre les paramètres du spermogramme et l'âge a été faite au moyen d'une régression linéaire. Ces paramètres sont les suivants :

- * Volume de l'éjaculat (ml)
- * Numération totale (en %)
- * La mobilité normale et diminuée (a+b) (en %)
- * Pourcentage de tératospermie ou formes atypiques (%)

Pour chaque paramètre, nous avons calculé la droite de régression, le pourcentage de variance expliqué par la régression (r^2) et le coefficient de corrélation (r).

Les 327 patients de cet échantillon ont été répartis en classes d'âge de 5 ans. Les valeurs moyennes de chaque paramètre du sperme ont été calculées puis comparées entre elles, pour chaque classe d'âge, par un écart réduit, ou un t de student.

- **La liaison entre les caractéristiques du sperme et l'âge :**

- A. Etude de la régression linéaire des caractéristiques du sperme en fonction de l'âge :**

Dans notre échantillon nous avons décelé :

Une corrélation hautement significative entre **l'âge et la mobilité** des spermatozoïdes (**P=0,01**) avec un coefficient de corrélation positif $r = 0,135$ $r^2=0,015$

Aucune liaison significative pour les quatre paramètres selon l'âge et cela est confirmé par les pourcentages de variances expliqués par la régression (r^2) et les coefficients de corrélation r qui sont :

Pour le volume de l'éjaculat : $r^2 = 0,005$ et $r = - 0,077$ (n s) $P = 0,151$

Pour la numération des spermatozoïdes : $r^2 = 0,004$ et $r = 0,081$ (ns) $p = 0,129$

Pour le pourcentage de tératozoospermie : $r^2 = 0,009$ et $r = 0,09$ $P=0,08$

n s

Ce:



és dans les tableaux suivants :

Si $r^2 = 0,015$ $r = 0,135$ $P = 0,01$ **il existe une corrélation entre les deux variables**

Si $p < = 0,05$ **il existe une corrélation significative ente les deux variables**

Si $p < = 0,01$ il existe une corrélation hautement significative entre les deux variables

Si $p < = 0,001$ il existe une corrélation très hautement significative entre les deux variables

Tableau. 28: Matrice de corrélation de Pearson des Caractéristiques du sperme tout âge confondu

		Age	Volume	Numération	Mobilité	Formes atypiques
Age		1				
Volume	Pearson Correlation	-0,076	1			
	P- value	0,166				
Numération	Pearson Correlation	0,066	0.016	1		
	P- value	0,228	0.774			
Mobilité	Pearson Correlation	0,125	-0.032	0.055	1	
	P- value	0,023*	0.563	0.313		
Formes atypique	Pearson Correlation	-0.096	0.040	0.202	0.420	1
	P- value	0,082	0.462	0.0002***	0.000***	

* **Significative à 0.05**

*****Significative à 0.001**



RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau. 29: Matrice de corrélation de Pearson des Caractéristiques du sperme des patients dont l'âge est entre 26-30

		Age	Volume	Numération	Mobilité	Formes atypiques
Age	Pearson Correlation	1				
	P- value					
Volume	Pearson Correlation	0.214	1			
	P- value	0.460				
numération	Pearson Correlation	0.119	0.264	1		
	P- value	0.683	0.361			
mobilité	Pearson Correlation	0.224	-0.527	-0.039	1	
	P- value	0.440	0.05*	0.890		
Formes atypiques	Pearson Correlation	0.497	0.330	0.032	-0.322	1
	P- value	0.07	0.248	0.910	0.261	

***Significative à 0.05**

Tableau. 30: Matrice de corrélation de Pearson des Caractéristiques du sperme dont l'âge est entre 31-35

		Age	Volume	Numération	Mobilité	Formes atypiques
Age	Pearson Correlation	1				
	P- value					
Volume	Pearson Correlation	-0.059	1			
	P- value	0.632				
Numération	Pearson Correlation	0.079	0.045	1		
	P- value	0.511	0.704			
Mobi	Pearson	-0.158	0.165	0.029	1	
		0.186	0.166	0.809		
Form atypi		0.039	-0.142	0.430	-0.205	1
		0.742	0.234	0.0001***	0.08	

Optimized using trial version
www.balesio.com

***** significative à 0.001**

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau. 31 : Matrice de corrélation de Pearson des Caractéristiques du sperme dont l'âge est entre 36-40

		Age	Volume	Numération	Mobilité	Formes atypiques
Age	Pearson Correlation	1				
	P- value					
Volume	Pearson Correlation	-0.054	1			
	P- value	0.541				
Numération	Pearson Correlation	-0.097	0.116	1		
	P- value	0.273	0.191			
Mobilité	Pearson Correlation	-0.022	-0.081	0.101	1	
	P- value	0.799	0.359	0.240		
Formes atypiques	Pearson Correlation	-0.033	-0.131	-0.115	-0.446	1
	P- value	0.703	0.138	0.192	00000***	

*** significative à 0.001

Tableau. 32: Matrice de corrélation de Pearson des Caractéristiques du sperme dont l'âge est entre 41-45

		Age	Volume	Numération	Mobilité	Formes atypiques
Age	Pearson Correlation	1				
	P- value					
Volume	Pearson Correlation	0.04	1			
	P- value	0.750				
Numération	Pearson Correlation	-0.09	-0.157	1		
	P- value	0.475	0.209			
Mo	n	0.192	-0.032	0.024	1	
	n	0.124	0.794	0.849		
For atyp	n	-0.331	0.031	-0.136	-0.471	1
	n	0.006**	0.805	0.278	0.0000***	

**

***significative à 0.001

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau. 33: Matrice de corrélation de Pearson des Caractéristiques du sperme dont l'âge est de 46-50

		Age	Volume	Numération	Mobilité	Formes atypiques
Age	Pearson Correlation	1				
	P- value					
Volume	Pearson Correlation	-0.221	1			
	P- value	0.195				
Numération	Pearson Correlation	0.100	0.023	1		
	P- value	0.558	0.893			
Mobilité	Pearson Correlation	0.106	0.018	0.071	1	
	P- value	0.537	0.913	0.678		
Formes atypiques	Pearson Correlation	-0.051	-0.133	-0.338	-0.383	1
	P- value	0.763	0.437	0.04*	0.021*	

* **Significative à 0.05**

Tableau. 34: Matrice de corrélation de Pearson des Caractéristiques du sperme dont l'âge est de 51-55 ans

		Age	Volume	Numération	Mobilité	Formes atypiques
Age	Pearson Correlation	1				
	P- value					
Volume	Pearson Correlation	-0.453	1			
	P- value	0.119				
Numération	Pearson Correlation	-0.308	-0.121	1		
	P- value	0.305	0.692			
Mobi	Pearson	-0.149	-0.125	-0.022	1	
		0.625	0.682	0.940		
Form atypic		-0.051	-0.144	0.124	-0.627	
		0.868	0.637	0.686	0.021*	

* S



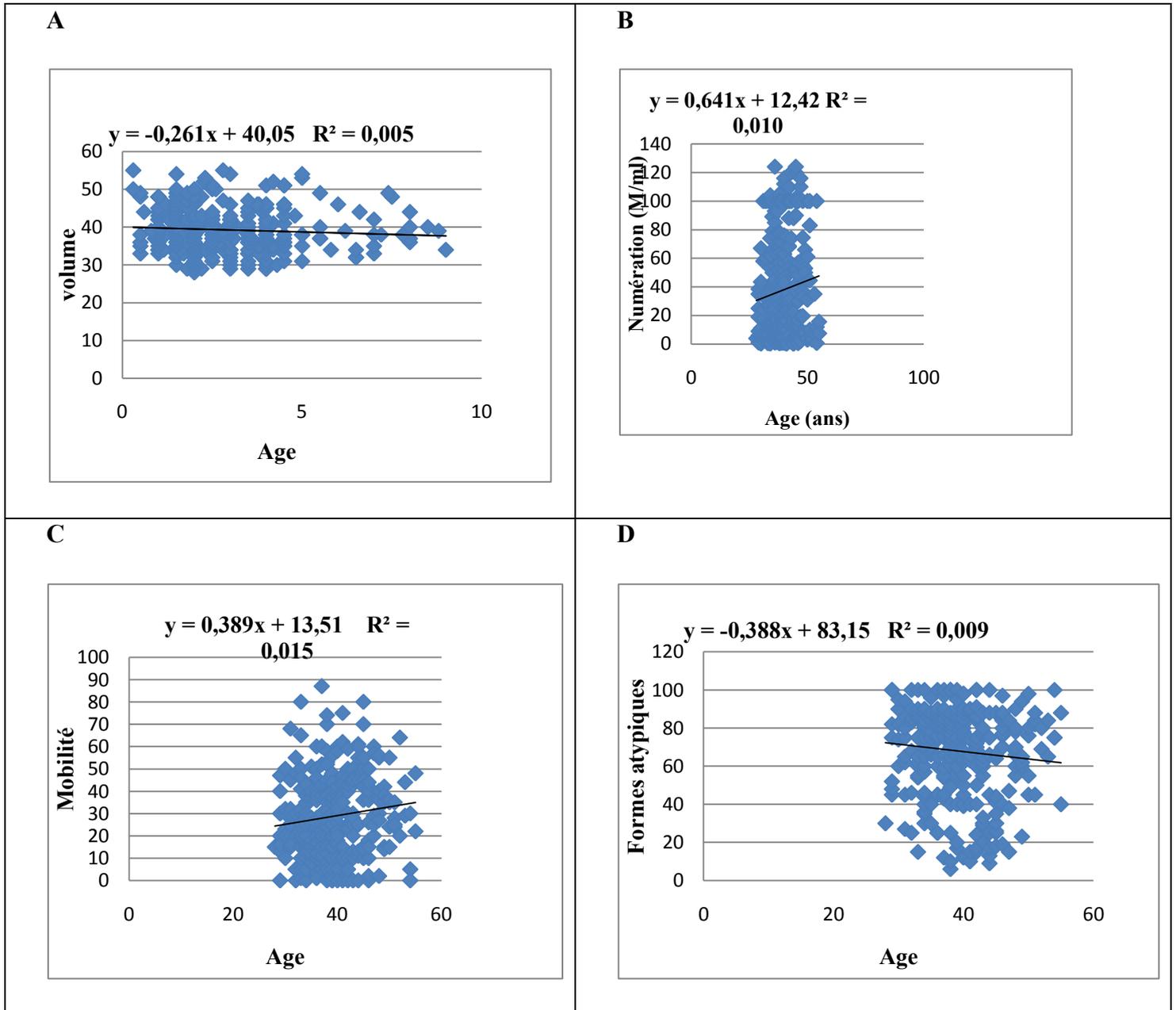


Figure. 27: Evolution des paramètres spermatisques en fonction de l'âge

A volume spermatisque, B numération, C Mobilité, D morphologie spermatisque (% de for.



RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau. 35: Résultats de la comparaison entre les classes d'âge pour les différents paramètres

Variabes	Source des variations	Somme des carrés	degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité
Age	Entre Groupes	10358.03	5	2071.61	1097.27*	9.29E-210
	A l'intérieur des groupes	653.24	346	1.89		
	Total	11011.27	351			
Volume	Entre Groupes	9.69	5	1.94	0.67	0.643
	A l'intérieur des groupes	993.02	346	2.87		
	Total	1002.71	351			
Numération	Entre Groupes	42067.59	5	8413.52	1.66	0.145
	A l'intérieur des groupes	1757869.03	346	5080.55		
	Total	1799936.62	351			
Mobilité	Entre Groupes	2904.11	5	580.82	1.96	0.084
	A l'intérieur des groupes	102680.98	346	296.77		
	Total	105585.09	351			

Ddl : degré de liberté

SCE : somme de carrés des écarts

F o : valeur critique de F de FISHER

P : probabilité de se en évidence des différences significatives

(tableau. 36) valeurs moyennes des paramètres du sperme par classe d'âge



Tableau. 36 : Moyennes des caractéristiques du spermogramme selon les classes d'âge

Classes d'âge (ans)	Effectifs	Volume (ml)	Numération ($10^6/ml$)	Mobilité(%)	Formes atypiques(%)
26-30	14	2.9±1	19±20.2	24.7±14.3	72.5±22.1
31-35	71	3.1±1.7	35.8±34.1	25.2±16.6	70.1±20
36-40	128	3±1.7	34.1±33	28.5±16.6	70.7±21.1
41-45	65	2.6±1.5	50.2±41	32.6±20.1	57.7±27.1
46-50	36	2.7±1.8	39.9±36.5	31.8±16.1	67.7±21.3
51-55	13	3.2±1.4	32.6±37.6	28.8±16.9	75±17
Total	327	2.9±1.6	37.6±35.6	28.8±17.4	67.9±22.6

c. Liaison entre les différents paramètres du sperme :

c1. L'étude de corrélation entre les différents paramètres du sperme dans l'échantillon de 327 patients tout âge confondu a permis de déceler ce qui suit :

Dans cette échantillon, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre la numération et le volume ($r = + 0.016$, n s), la mobilité ($r = + 0.055$, n s).

En revanche, le pourcentage des formes atypiques (téatospermie) est très hautement corrélé significativement avec la mobilité d'une part ($r = +0.420$, $p < 0.001$) et avec la numération d'autre part ($r = +0.202$, $p < 0.001$).

c.2. L'étude de corrélation entre les différents paramètres du sperme dans l'échantillon de 327 patients pour les différentes classes d'âge a permis de déceler ce qui suit :



Une corrélation positive entre le volume et la mobilité pour la classe d'âge de 26-30 ans avec $r = + 0.557$ et $p < 0.050$.

Une corrélation très hautement significative entre la numération et le pourcentage de formes atypiques pour la classe d'âge de 31-35 ans avec ($r=0.430$ et $p<0.001$)

Une corrélation très hautement significative entre la mobilité et les formes atypiques pour les classes d'âge de 36-40 ans et 41-45 ans avec respectivement ($r=-0.446$ et $p<0.001$), ($r=-0.471$ et $p<0.001$)

Une corrélation significative entre la numération et les formes atypiques pour la classe d'âge de 46-50 ans avec ($r= - 0.383$ et $p<0.05$)

Une corrélation significative entre la mobilité et les formes atypiques pour les classes d'âge de 46-50ans et 50-55 ans avec respectivement ($r=-0.383$ et $p<0.05$), ($r=-0.627$ et $p<0.05$)

d. Valeurs moyennes des paramètres spermatiques calculés sur l'ensemble de l'échantillon :

Le volume moyen de l'éjaculat, calculé sur l'ensemble de l'échantillon (327 cas), est de 2.9 ± 1.65 ml, la numération moyenne des spermatozoïdes est de 37.6 ± 35.6 ($\times 10^6/\text{ml}$), la mobilité moyenne des formes (a+b) est de 29.23 ± 17.30 %, le pourcentage de tératospermie ou formes atypiques est de $67.21\pm 22.47\%$.

La profession

L'étude de la dépendance entre la profession et les paramètres spermatiques a montré une diminution significative de la numération $p<0.01$ des cuisiniers, chauffeurs et ouvriers en comparaison avec le groupe des professions libérales et une diminution significative $p<0.05$ de la numération dans le groupe des cuisiniers, chauffeurs, ouvriers et agriculteurs ensembles en comparaison avec les autres groupes (tableau. 37).



RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau. 37 : Comparaison des valeurs moyennes des paramètres spermatiques des 7 groupes professionnels

Groupe professionnel	Effectifs	Numération (10 ⁶ /ml)	Mobilité (%)	Morphologie (%)	Volume (ml)
Groupe1	33	27.5±29.8*	24.4±18.6	71.6±25.1	3.1±1.8
Groupe2	07	34.3±32.2	23.9±13	64.9±23.5	3.3±2.3
Groupe3	18	28.3±24.1**	28.8±18.3	61.9±26.9	2.8±1.5
Total Groupes 1-3	58	28.5±28***	25.7±17.8	66.1±26.6	3±1.8
Groupe4	63	34.8±40	30±19.4	68.5±22.2	3.2±1.8
Groupe5	48	52.5±38.6* **	31.4±18.6	65±22.9	2.9±1.9
Groupe6	60	41.6±38.6	27.7±16.4	66.2±22.2	2.8±1.6
Groupe7	88	39.9±41.9	29.6±16.1	71.2±20.6	2.8±1.4
Total Groupes 4-7	259	41.4±40 ***	29.6±17.4	68.2±21.8	2.9±1.6
Grand Total	317	38±35.7	28±17.2	67±23.3	3±1.8

Les résultats sont présentés comme moyenne ± écart type.

Les différences significatives entre les groupes ont été notées : * p<0.01, **, *** p<0.05.

Groupes 1 : cuisiniers et chauffeurs / **Groupe2 :** agriculteurs/ **Groupe3 :** ouvriers/**Groupe 4:** agents de sécurité, les militaires/ **Groupe5 :** libérales / **Groupes 6 :** commerçants /

Gr



es. aussi une différence significative des paramètres spermatiques p<0.05 entre les groupes qui prennent régulièrement les bains chauds et ceux qui ne les prennent pas avec une augmentation de la numération et du volume chez les patients

qui prennent régulièrement les bains chauds par rapport à ceux qui ne les prennent pas (tableau. 38).

Tableau. 38 : Influence des bains chauds sur les différents paramètres spermatiques

Groupes	Effectifs	Numération (10 ⁶ /ml)	Mobilité (%)	Morphologie (%)	Volume (ml)
Peu de bains chauds	217	38.1±37.3*	28.8±17	68.1±22.1	2.8±1.4*
Adeptes de bains chauds	110	39.4±40.9*	28.8±18.2	67.6±23.6	3.2±2*
Total	327	38.6±38.5	28.8±17.4	67.9±22.6	2.9±1.6

Les résultats sont présentés comme moyenne ± écart type.

Les différences significatives entre les groupes ont été notées : * p<0.05

Influence de la consommation du tabac et d'alcool sur les différents paramètres spermatiques

Influence de la consommation de la cigarette sur les paramètres spermatiques

Le lien entre le tabagisme et les paramètres du sperme n'a pas montré de différence significative de la mobilité, morphologie, et le volume des deux groupes, mais la différence dans la numération a montré une diminution dans le groupe qui ne fume pas (Tableau. 39). L'étude de l'influence du tabagisme et la consommation d'alcool ensemble n'a pas montré de différence significative de la mobilité, morphologie et volume du sperme, mais la différence significative dans la numération entre les deux groupes de NF / NA et F / NA a montré une diminution de la numération dans le groupe de NF / NA (tableau. 40).



RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau. 39 : Influence de la consommation de la quantité du tabac sur les différents paramètres spermatiques

Groupes	Effectifs	Numération (10 ⁶ /ml)	Mobilité(%)	Morphologie (%)	Volume (ml)
Groupe1	38	37.5±36.6	29.8±17.9	70.4±19.4	2.9±1.9
Groupe2	76	44.4±38.9***	28.6±16.9	67.9±21.7	2.7±1.6
Groupe 1+2	114	42.1±38.1	29±17.1	68.7±20.9	2.8±1.7
Groupe3	168	32.7±31.9***	30±17.9	67±23.3	2.8±1.7
Total	182	36.5±34.8	29.6±17.6	67.7±22.4	2.9±1.6

Les résultats sont présentés comme moyenne ± écart type, *, ** p <0.05.

Groupe 1: fumeurs <20c/j / **groupe2:** fumeurs >20c/j / **groupe1+2 :** fumeurs / **groupe 3 :** non fumeurs

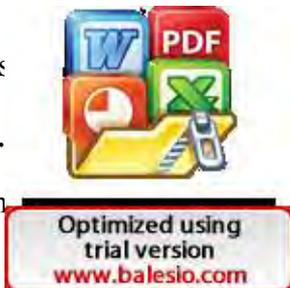
Tableau. 40 : Influence de la consommation du tabac et d'alcool sur les différents paramètres spermatiques

Groupes	Effectif	Numération (M/ml)	Mobilité (%)	Morphologie (%)	Volume (ml)
Groupe1	30	31±31.8	30.5±15.7	66.2±28	2.5±1.5
groupe2	109	44.4±38.6*	28.6±17.5	67.9±20.2	3.1±1.6
groupe3	173	33.3±32.4*	28.5±17.3	67.3±23.2	3±1.7
Total	312	37±35	29.2±16.8	67.1±23.8	2.8±1.6

Les résultats sont présentés comme moyenne ± écart type, * p <0.05.

Gr : fumeurs / **groupe 2 :** fumeurs non alcooliques / **groupe3 :** non fumeurs

cas en fonction des résultats des différents paramètres spermatiques



Répartition des cas en fonction du volume de l'éjaculat :

Dans les résultats du spermogramme nous avons trouvé que 55.02 % des patients ont un sperme de volume normal, et 44.9% ont un sperme de volume anormal (figure. 28).

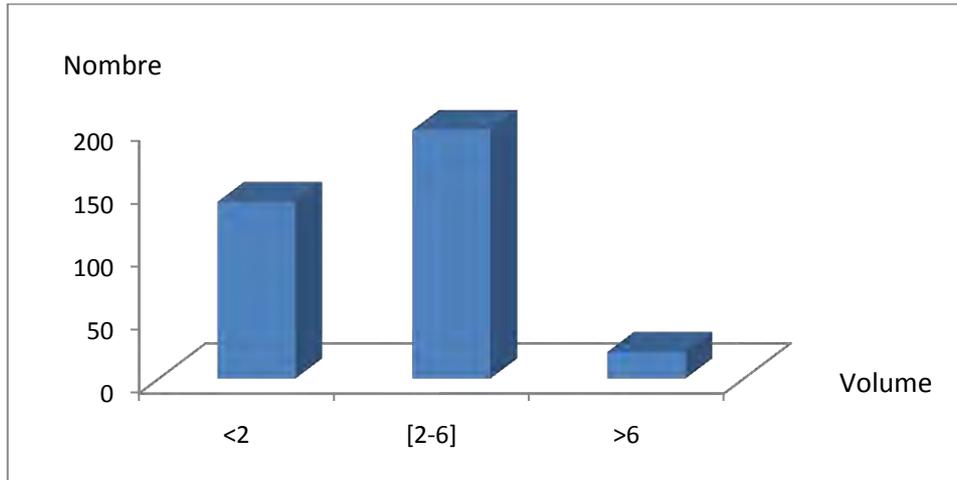


Figure. 28 : Répartition des cas en fonction du volume

Répartition des cas en fonction de la numération

Dans les résultats du spermogramme nous avons trouvé que 45.8 % des patients ont une numération normale, et 54.2% ont une numération pathologique (tableau. 41), (figure. 29).

Tableau. 41: Répartition des cas en fonction de la numération

Numération (M/ml)	Effectif	Pourcentage(%)
<5	137	33.9
5-20	82	20.3
20-200	185	45.8
Total	404	100



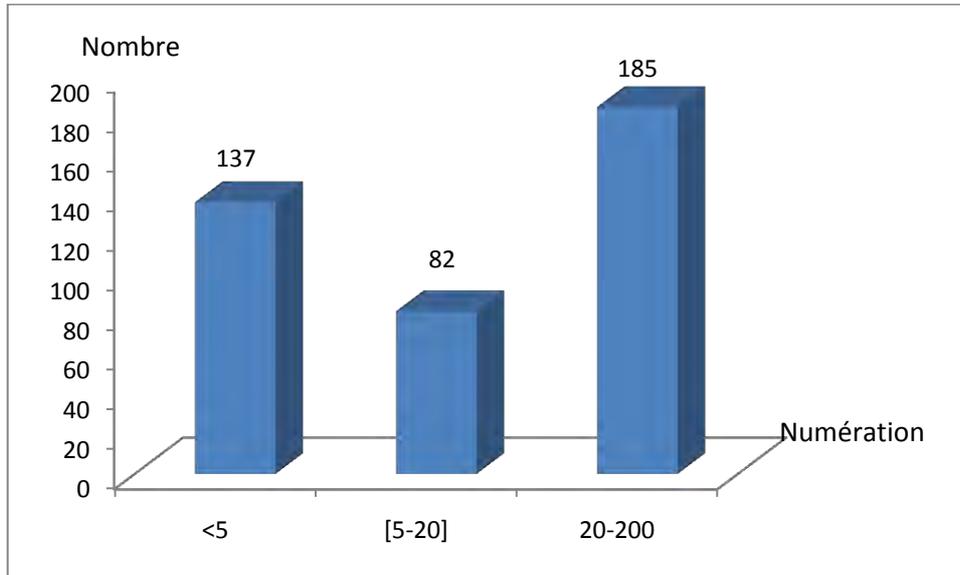


Figure.29 : Répartition des cas en fonction de la numération

Répartition des cas en fonction de la mobilité

Dans les résultats du spermogramme nous avons trouvé que 9.3 % des patients ont une mobilité normale, et 90.6% ont une numération pathologique (tableau. 42).

Tableau.42 : Répartition des cas en fonction de la mobilité

Mobilité (%)	Effectif	Pourcentage (%)
00	15	4.2
<50	305	86.4
>50	33	9.3
Total	353	100



Répartition des cas en fonction de la morphologie des spermatozoïdes

Dans les résultats du spermocytogramme nous avons trouvé que 42.8 % des patients ont une morphologie normale, et 57.2 % ont une morphologie anormale (tableau. 43), (figure. 30).

Tableau. 43 : Répartition des cas en fonction des formes typiques des spermatozoïdes

Formes typiques (%)	Effectifs	Pourcentage(%)
00	14	4.3
0-30	173	52.9
30-100	140	42.8
Total	327	100

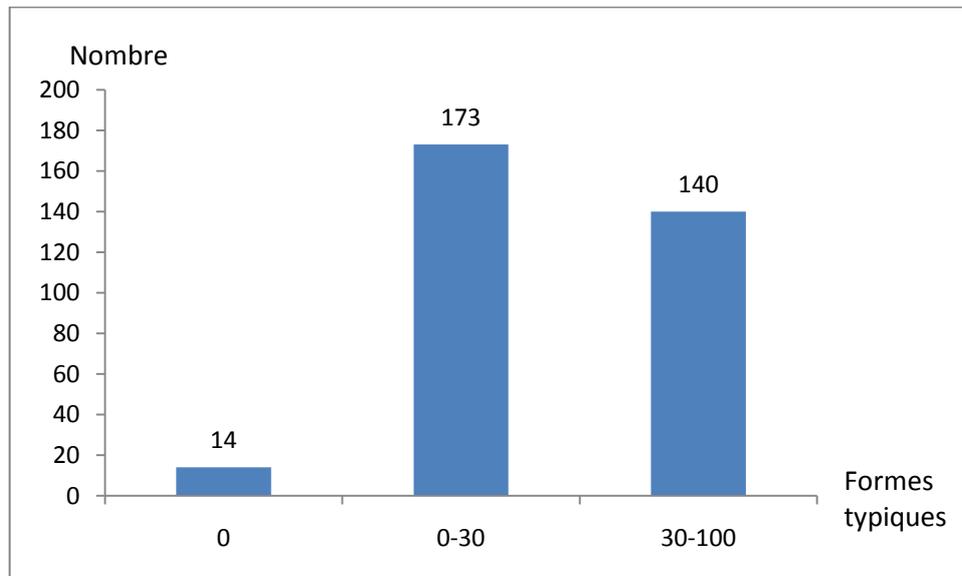


Figure 30 : Répartition des cas en fonction de la morphologie des spermatozoïdes



Résultats d'ICSI

Parmi les 404 patients destinés à faire une PMA, nous avons étudié les résultats de 362 patients ayant fait l'ICSI. Parmi les 3015 ovocytes collectés, 2510 ovocytes matures ont été obtenus, 1797 sont fécondés (2PN), 1645 forment des embryons, 831 embryons ont été transférés et 139 embryons ont été congelés (Tableau. 44). Taux de grossesse par cycle est de 38.2% et le taux de grossesse par transfert est de 41%.

Calcul du taux de fécondation

Taux de fécondation = nombre de zygotes / nombre d'ovocytes matures = **71.6±25.2%**.

Calcul du taux d'implantation :

Taux d'implantation = nombre d'embryons nidés / nombre d'embryons transférés = **19.7%**.

Tableau. 44 : Paramètres biologiques

Paramètres	Nombre	Moyenne ± SD
Follicules	3027	9.1±4.6
Ovocytes	3015	8.6±4.4
Ovocytes matures	2510	7.1±3.8
Zygotes	1797	5.1±3
Embryons	1645	4.7±2.8
Embryons transférés	831	2.3±0.8
Embryons congelés	139	0.3±1.1



sui
em

Optimized using
trial version
www.balesio.com

ons transférés

embryons représente le taux le plus élevé avec 187 cas soit 56.3 %
embryons avec 110 cas soit 33.1% ainsi que le transfert d'un seul
t 9.03%, le transfert de plus de 4 embryons représente le taux le
plus bas avec 5 cas soit 1.5% (tableau. 45).

Tableau. 45 : Fréquence des embryons transférés

Embryons transférés	Fréquence	Pourcentage (%)
1	30	9.03
2	110	33.1
3	187	56.3
4	5	1.5
Total	332	100

Répartition des cas selon les résultats d'ICSI

Les résultats d'ICSI négatifs représentent le pourcentage le plus élevé avec 196 cas (55.05 %), suivi des résultats positifs avec 136 cas (38.2%), des ponctions blanches avec 16 cas (4.5 %) et les échecs de fécondance avec 8 cas (2.2%) (figure. 31).

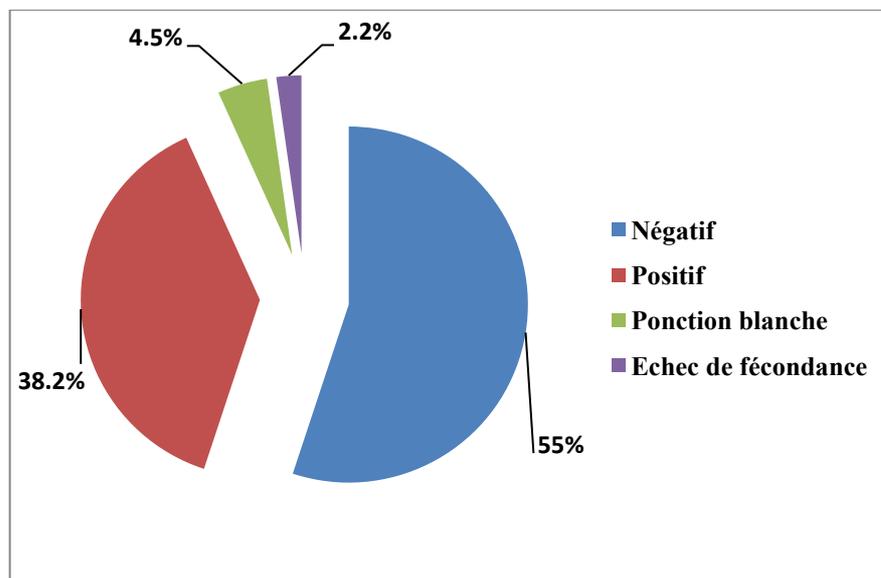


Figure. 31 : Répartition des cas selon les résultats d'ICSI



Optimized using trial version www.balesio.com

les résultats positifs montrent que parmi les 136 cas ayant eu des grossesses, 86 cas (63.2%) (45 filles et 41 garçons), ABRT n= 24

cas (17.6%), 24 cas sont des jumeaux (17.6%) et 2 cas sont des triplets (1.5%) (tableau. 46).

Tableau. 46: Répartition des cas en fonction des résultats positifs

Résultats positifs	Effectif	Pourcentage (%)
Unique	86	63.2
ABRT	24	17.6
Jumeaux	24	17.6
Triplets	2	1.5
Total	136	100

Les chances de grossesses augmentent significativement avec le nombre d'embryons transférés allant de 3.7 % avec un seul embryon jusqu'à 61.8% avec 3 embryons. La plus grande différence a été observée entre les patients ayant un et deux embryons transférés.

Tableau. 47 : Les chances de grossesse par cycle de traitement en fonction du nombre des embryons transférés

	Nombre d'embryons transférés			
	1	2	3	4
Nombre de patients	30	110	187	5
N(%) de grossesses	5 (3.7)	45 (33.1)	84 (61.8)	2 (1.5)

$X^2 = 36.41$ $p < 0.0001$



Tableau. 48 : Les résultats d'ICSI en fonction du nombre d'embryons transférés

Résultats d'ICSI	négatif		positif		TOTAL	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
1	25	83.3	5	16.7	30	100
2	65	59.1	45	40.9	110	100
3	103	55.1	84	44.9	187	100
4	3	60	2	40	5	100
TOTAL	196	59	136	41	332	100

Le tableau montre une différence significative entre le nombre d'embryons transférés et les résultats d'ICSI $P < 0.01$.

Les chances de grossesse multiple ont également augmenté avec le nombre d'embryons transférés.

Tableau. 49 : Les chances de grossesses en fonction du nombre d'embryons transférés

	Nombre de patients	Nombre de naissances		
		1	jumeaux	triplets
1	30	4	0	0
2	110	29	10	0
3	187	53	14	2
4	5	0	0	0
To		86 (76.7%)	24 (21.4%)	2 (1.8 %)

Ré  **ction des embryons congelés**

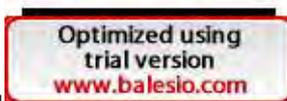
45  é d'une congélation des embryons, Parmi les 3015 ovocytes collectés, 139 embryons ont été congelés.

Tableau. 50 : Répartition des cas en fonction des embryons congelés

Embryons congelés	Effectifs	Pourcentage (%)
0	305	87.1
1	2	0.6
2	15	4.3
3	13	3.7
4	8	2.3
5	6	1.7
6	1	0.3
Total	350	100

Résultats d'ICSI et consommation de la cigarette

Nos résultats montrent que la plupart des patients qui fument ont des résultats négatifs 81 cas contre 67 cas qui ont des résultats positifs. Nous n'avons pas trouvé de différence significative entre la consommation de la cigarette et les résultats d'ICSI (tableau. 51).

Tableau. 51 : Tabac et résultats d'ICSI

Résultats d'ICSI	Fumeur	Non fumeur	Non mentionné	TOTAL
Echec fécondance	4	2	2	8
Négatif	81	106	9	196
Positif	9	6	1	16
Total	67	65	4	136
	161	179	16	356



Résultats de génétique

Les patients avec macrocéphalie

1. Spermogramme et spermocytogramme

Les paramètres spermatiques

Les résultats des spermogrammes sont présentés dans le tableau. 52. Ces résultats montrent que la numération varie de 0.1-30.5 millions de spermatozoïdes par millilitre (M/ml) avec une moyenne de 5.8 M/ml. Seuls deux patients (1,4) ont une numération normale. La mobilité moyenne est très diminuée (11.3%) ainsi que la vitalité qui varie de 30-50 % avec une moyenne de 40.76 %, aucun patient n'a une vitalité normale.

5 patients soit 35.71% ont une macrocéphalie partielle avec quelques formes typiques et 09 patients soit 64.28% ont une macrocéphalie homogène avec 100% de SM. Le diagnostic des patients montre une prédominance des OAT avec un pourcentage de 85.71 % contre 14.28% des AT.

Analyse de la morphologie des spermatozoïdes

L'analyse de la morphologie des spermatozoïdes montre dans presque tous les patients la coexistence des trois types des têtes des spermatozoïdes : irréguliers, réguliers et multiples. Les formes irrégulières sont les plus dominantes (66,1 %), seuls deux patients présentent plus de formes régulières que de formes irrégulières ou en double, en outre, tous les spermatozoïdes ont montré une tête élargie avec un facteur de largeur de 1,5 à 3 plus important que celui d'un spermatozoïde de control (figure. 32).



Tableau. 52 : Caractéristiques des patients ayant la macrocéphalie

	Age	Durée d'infertilité	Antécédents familiaux	Numération	Mobilité	Diagnostic	Spermocytogramme	Tentatives d'ICSI	Mutation du gène AURKC
M1	32	7	non La maman a 4 enfants morts	3.6 .10 ⁶	00 00 05 95	OAT 100% macro avec flagelle multiple	IR : 70 R : 30 M : 00	Pas d'ICSI	Muté c.114del C
M2	42	6	oui	30.5 . 10 ⁶	00 05 05 90	A T 100% avec nécospermie	IR : 66 R :30 M : 00	Pas d'ICSI	Muté c.114del C
M3	29	5	oui	6 . 10 ⁶	00 16 12 72	OAT 100% Macro avec flagelle multiple	IR : 55 R : 25 M :4	Pas d ICSI	Muté c.114del C
M4	33	7	non	560 000	00 25 10 65	OAT 100% macro avec flagelle multiple	IR : 66 R : 34 M : 00	Pas d ICSI	Muté c.114del C
			non	12.10 ⁶	00 20 12 68	OAT 100% macro avec flagelle multiple	IR : 91 R : 8 M :1	Pas d'ICSI	Muté c.114del C



Optimized using trial version
www.balesio.com

RESULTATS ET DISCUSSION

M6	38	10	oui	$0.5.10^6$	00 5 5 90	OAT 100% macro avec flagelle multiple	IR : 97 R : 3 M : 00	Pas d'ICSI	Muté c.114del C
M7	40	15	non	9.10^6	4.2%	OAT Macrocéphalie partielle 95% atypiques 5 %typiques	IR : 42 R : 56 M : 2	Une seule tentative d'ICSI Résultat : -	Muté c.114del C
M8	39	8	non	$16. 10^6$	00 28 15 57	OAT Avec macrocéphalie partielle F typiques 12% F atypiques 88%		Deux tentatives d'ICSI 1/ positif 2/ négatif 3/naturelle	Non muté
M9	40	6	non	$0.5.10^6$	00 6 10 84	OAT 100% macro Avec flagelle multiple		Pas d'ICSI	Muté p.248*
			mère 5 enfants morts						
			non	4.10^6	00 12 8 80	OAT 100%macro avec flagelle multiple IAM=1.36		Une seule tentative Pas de microinjection	Muté c.114del C



Optimized using
trial version
www.balesio.com

RESULTATS ET DISCUSSION

M11	40	7	non	$11 \cdot 10^6$	00 1 10 17 73	OAT 100% Macro avec flagelle multiple IAM 1.46	IR : 48 R : 50 M : 2	Pas d'ICSI	Muté c.114del C
M12	49	12	oui	$22.8 \cdot 10^6$	00 20 16 64	AT (macrocéphalie partielle avec flagelle multiple)		Une seule tentative -résultat négatif	Non muté
M13	40	15	non	$0.1 \cdot 10^6$	00 00 10 90	OAT macrocéphalie		-Pas d'ICSI	Non muté
M14	46	18	non	$5 \cdot 10^6$	00 1 14 85	OAT Macro partielle F typiques 5% F atypiques 95%		Une seule tentative - Résultat négative	Muté c.114del C

IR :



1 régulier / M : SM avec tête multiple / OAT : oligo-astheno-tératospermie/ AT : astheno-tératospermie/ F : forme

IAM : indice d'anomalies multiples

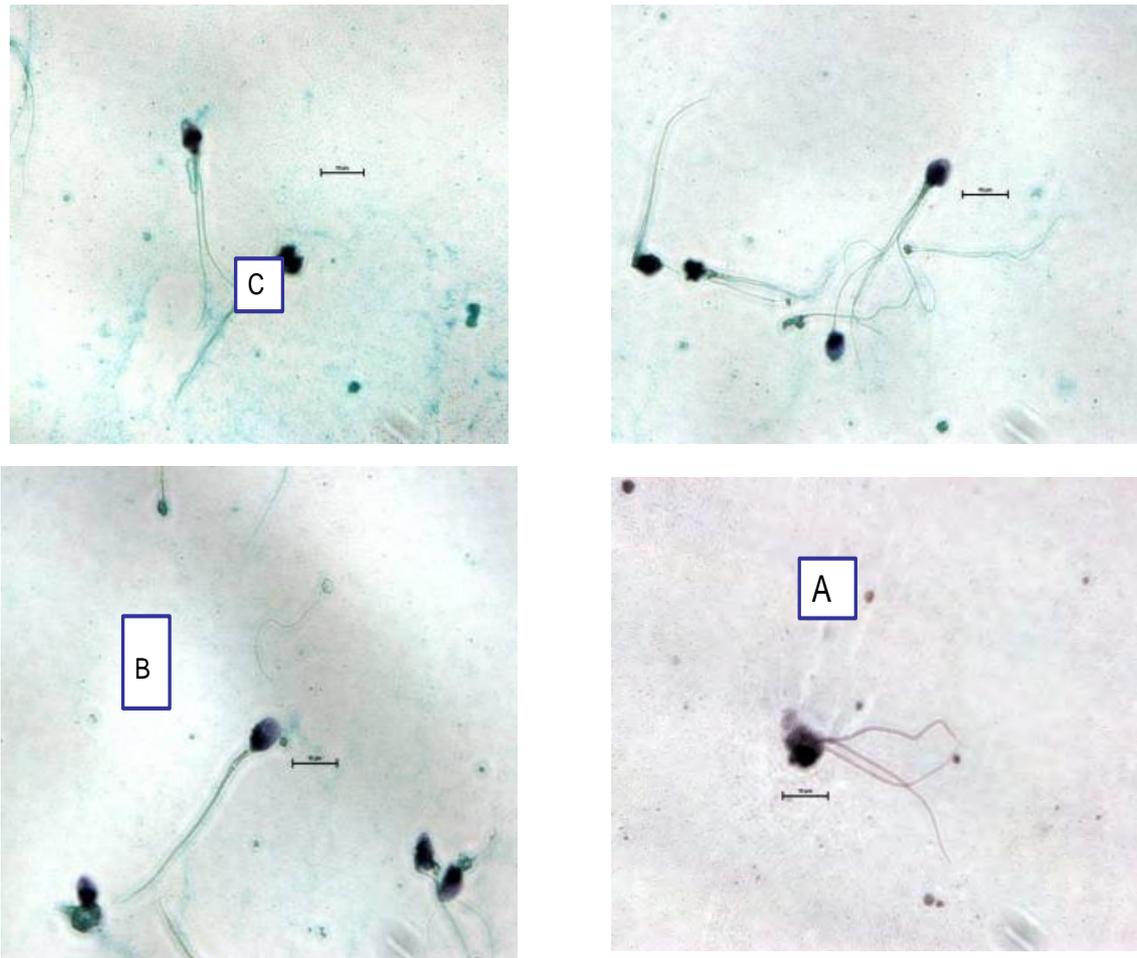


Figure. 32 : Les trois formes des spermatozoïdes macrocéphales (SM)

A : SM irréguliers/ B : SM réguliers/ C : SM avec tête multiple

Analyse génétique :

AURKC a été séquencé pour les 14 patients. Une mutation dans l'exon3 a été trouvée chez 10 patients (Fig. 34). Les autres pour les 4 patients restants. L'un portait une mutation dans l'exon 6 p. Une mutation a été identifiée pour 3 patients (Fig. 34). Ceci indique que la fréquence d'AURKC des patients atteints de macrocéphalie dans notre cohorte représente 78,5 % (11/14). La variante c.144delC représente 91 % des allèles



identifiée pour les deux autres patients (M12 et M8). Aucun embryon pourrait être transféré pour M12 tandis que deux tentatives d'ICSI ont été réalisées pour M8, dont l'un conduit à la naissance d'un enfant sain. En outre, ce couple s'est finalement réalisé une grossesse spontanée.

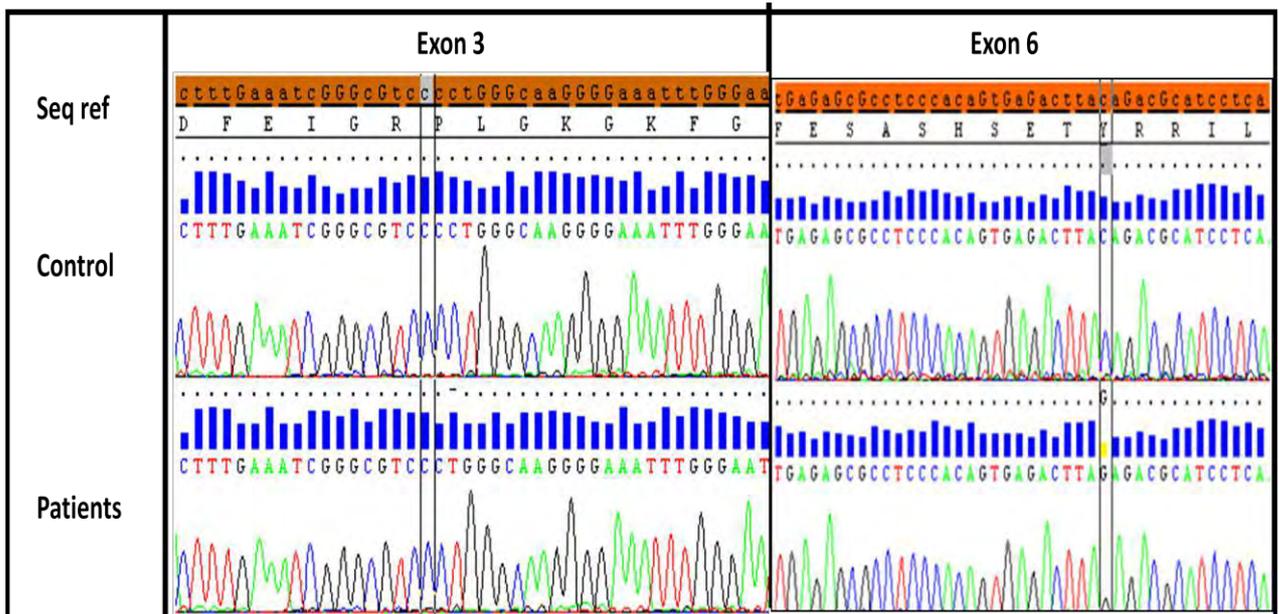


Figure. 34: Le diagnostic génétique d'AURKC exons 3 et 6.

Électrophérogramme montrant une partie de AURKC exon 3 et 6 à partir de : un sujet témoin (control) un patient souffrant d'une délétion homozygote c144delC de l'exon 3 et un autre patient avec p. Y248 * homozygote de l'exon 6.

Les patients atteints de globozoospermie

Caractéristiques spermatiques

La numération variaient de 12 à 171 M / ml avec une moyenne de 50,8 M / ml. La mobilité moyenne a diminuée (27%). Cinq patients ont OAT et 2 patients ont AT (voir tableau. 53).



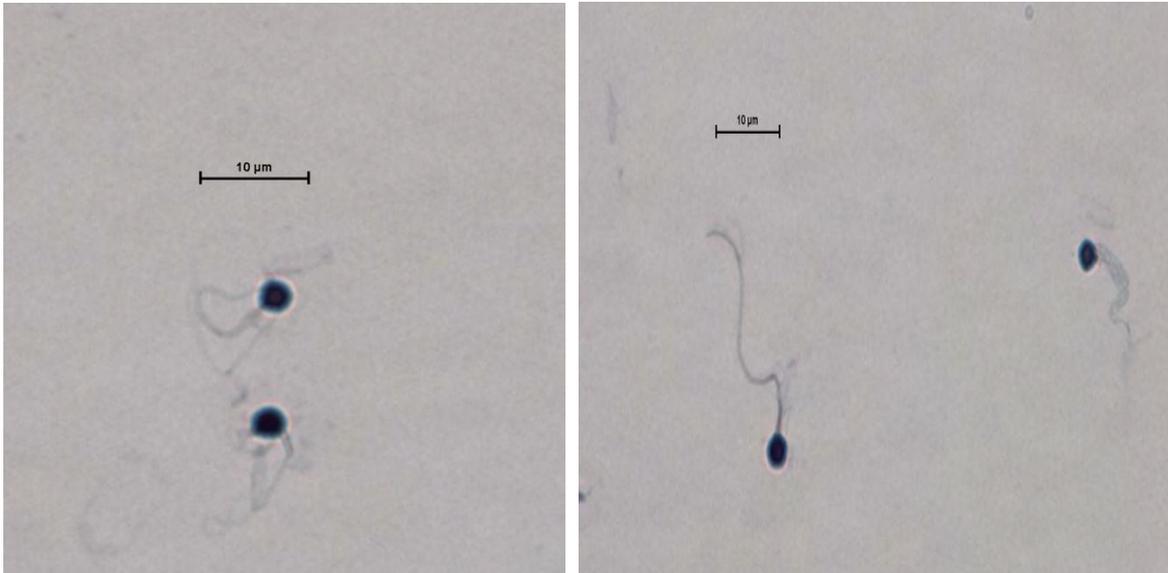


Figure. 35: Forme des spermatozoïdes globocéphales

Tous les patients analysés ($n = 5$) par la technique MLPA ont présenté une délétion homozygote de DPY19L2 (figure. 37), dont trois des sujets analysés étaient frères. Deux patients parmi les 7 recrutés n'ont pas accepté de réaliser le diagnostic génétique. Cette analyse indique que les trois sujets sans lien de parenté présentant une globozoospermie avaient une délétion DPY19L2. Tous les patients mutés avaient une histoire familiale d'infertilité. Des tentatives d'ICSI ont été faites pour le G1, G2, G6. Dans chaque cas, nous avons observé 100 % d'échec de la fécondation à l'exception le patient G6, qui a obtenu une grossesse gémellaire sur la première tentative ICSI.

Technique de comparaison (PCR duplex et PCR des exons 11,22)

Cette technique permet de confirmer la technique d'MLPA et la présence ou l'absence de la bande DPY19L2



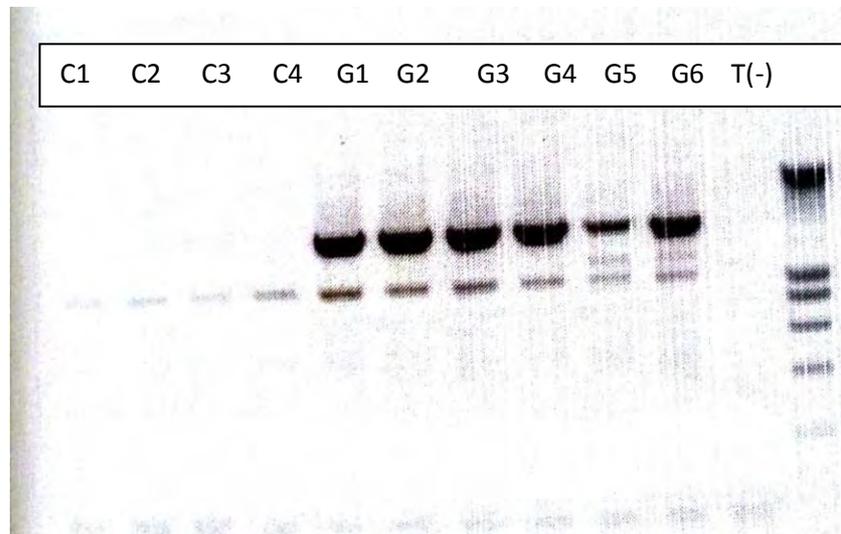


Figure. 36: Profil électrophorétique de la PCR duplex

C1, C2, C3, C4 : Contrôles négatifs, non délétés

G1, G2, G3, G4, G5 : les 5 Patients globo délétés homozygotes

G6 : délété hétérozygote

T(-) : témoin négatif de la PCR

Résultats

Pour les contrôles C1, C2 : PCR 1 négative pour bande DPY (2000pb), positive pour bande RYR1 (1000pb) et PCR 2 (exons 11 et 22) positive ce qui confirme l'absence de délétion de DPY19L2.

Pour les délétés homozygotes G1, G2, G3 : PCR 1 positive pour bande DPY (2000pb), positive pour bande RYR1 (1000pb) et PCR (exon 11 et 22) négative : délétion homozygote de DPY19L2.

Poi
poi
DP



zygote G6 : PCR 1 positive pour bande DPY (2000pb), positive pb) et PCR2 (exons 11 et 22) positive : délétion hétérozygote de séquençage de DPY19L2.

Résultats finals

La PCR duplex : indique que les patients délétés homozygotes sont bien délétés, ayant les 2 bandes de RYR1 et de DPY19L2.

La bande indique : l'amplification des 2 régions LCR1 et LCR2 et par la suite l'absence de DPY19L2 (Figure. 36)

Résultats d'analyse en MLPA :

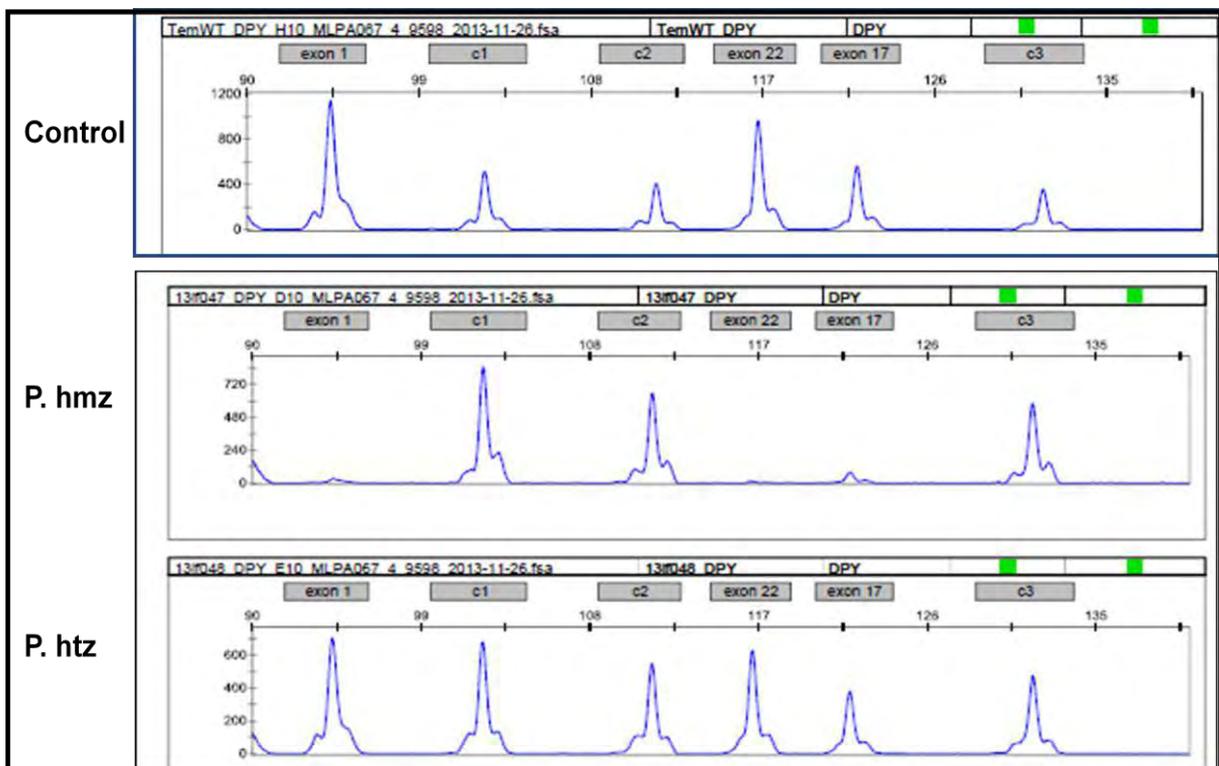


Figure. 37: Analyse MLPA de DPY19L2 exon 1, 17, 22 sondes fixées contiennent trois sondes de contrôle à des fins de normalisation (c1, c2, c3) et trois sondes DPY19L2 spécifiques (X1, X17 et X22) correspondant à l'exon 1, 17 et 22 de DPY19L2. (Voie 1)

MI  ilion de l'ADN normal (contrôle). (Voie 2) Profil de MLPA d'un pat te montrant une absence totale de signaux des sondes d'exons DP profil MLPA d'un patient délété hétérozygote montrant une din e sondes DPY19L2 spécifiques.

Optimized using trial version www.balesio.com

Tableau. 53: Caractéristique des patients ayant la globozoospermie

	Histoire familiale	Numération (M/ml)	Mobilité (%)	Diagnostic	Tentatives d'ICSI	Mutation <i>DPY19L2</i>
G1	oui	171	20	AT 100% globozoospermie	Une tentative Résultat négatif	Délétion Homozygote <i>DPY19L2</i>
G2	oui 2 frères infertiles	40	15	OAT 95% globozoospermie	deux tentatives Résultat négatif	Délétion Homozygote <i>DPY19L2</i>
G3	oui frère de G4 et G5	16	30	OAT 100% globozoospermie	Pas d'ICSI	Délétion Homozygote <i>DPY19L2</i>
G4	oui frère de G3 et G5	40	31	AT 100% globozoospermie	Pas d'ICSI	Délétion Homozygote <i>DPY19L2</i>
G5	oui frère de G3 et G4	56	25	OT 100% globozoospermie	Pas d'ICSI	Délétion Homozygote <i>DPY19L2</i>
G6	Non	15	40	OAT 90% globozoospermie	Une tentative Résultat : positif (naissance gémellaire)	Pas d'ADN
G7	Non	12	28	OAT 100% globozoospermie	Deux Résultat: négatif	Pas d'ADN



Au terme de cette étude nous avons tenté d'éclairer les causes des perturbations spermiologiques même si le spermogramme à lui seul ne permet pas le plus souvent de mettre en œuvre les causes de l'infertilité. La recherche de facteurs de risque doit être exhaustive. En effet comme l'a suggérée Everaert l'infertilité est multifactorielle et souvent une synergie de facteurs de risque peut exister. Leur identification est donc fondamentale (Wood et al. 1984).

Lors de la réalisation de ce travail, nous avons noté une fréquence des spermogrammes et spermocytogrammes pathologiques de 83.3%, Ce qui révèle une importante fréquence de l'infertilité masculine dans le Constantinois, nos résultats concordent avec ceux de la littérature avec 81.5% (Toure et al., 1995) et 91.9% (Koikana Chacka 1998) des spermogrammes et spermocytogrammes pathologiques. Parmi les 404 patients retenus, 70.5% représentent des indications masculines et 29.5% représentent des indications mixtes masculines et féminines. Par ailleurs, la plupart des études s'accordent sur le fait qu'au cours des dernières années, on note un déclin remarquable du taux de fertilité dans les pays du nord (Kaufmann et al., 1998), (Pearce et al., 1999). Plusieurs études ont montré que l'infertilité masculine isolée ou non est présente dans plus de 50% des infertilités du couple. Une étude Africaine, réalisée au Nigéria sur 340 couples infertiles, a retrouvé une cause masculine dans 42.4 % (Ikechebelu et al., 2003). Dans notre étude nous observons un taux d'anomalies masculines qui est environ deux fois plus élevé. Cette discordance peut être liée à une différence au niveau du recrutement ou des critères utilisés lors des analyses spermatiques. Par contre notre étude confirme le taux élevé de la part masculine dans l'infertilité du couple.

Quatre vingt dix pourcent de nos patients ont une infertilité primaire, ce taux très élevé peut s'expliquer par le contexte social et la tendance qu'auraient les couples n'ayant pas d'enfant à consulter plus souvent que les autres pour traiter leur infertilité. Des études menées en Algérie, dans la région de Annaba, indiquent des taux d'infertilité primaire de 73, econdaire de 26,52 % (Daroui 2001). Une autre étude menée dar taux respectifs signalés sont de 87% et 13% (Nazzal 2002),ce qui rej ar ailleurs, en France, les travaux de (Thonneau et al. 1991) rév ilité primaire et secondaire de 67 % et 33 % respectivement, la du té était marquée par une grande variabilité des extrêmes de 1 an jusqu'à 20 ans. La durée de 6-10 ans est la plus fréquente avec 45.3%, indiquant qu'une majorité des patients consulte tardivement. Nos résultats rejoignent ceux de la littérature



Optimized using
trial version
www.balesio.com

qui indiquent une durée moyenne de 6 ans et des extrêmes allant 1 à 30 ans (Niang et al., 2009).

Aujourd'hui le spermogramme est l'examen clé pour explorer la fertilité masculine. Cependant, sa sensibilité et sa spécificité dans l'approche diagnostique restent modérées rappelle les éventuelles limites de son interprétation (Freour et al., 2010).

Sur le plan biologique les résultats liés aux spermogrammes et spermocytogrammes indiquent que l'OAT et l'A sont les deux anomalies les plus représentatives avec respectivement 25.7 % et 20.5%. Une AT est notée pour 79 cas (19.5%), l'azoospermie est notée chez 46 cas (11.4%). Comparant aux résultats obtenus par (Zeghib 2009), l'asthénospermie (ATS) objectivée dans 33,33 % des cas est plus élevée par rapport à nos résultats et l'oligo-asthénospermie (OATS) objectivée dans 20,37 % des cas est très proche de nos résultats, suivie par l'azoospermie (AZ) 17,59 %.

L'oligozoospermie ou oligo-asthénospermie (OAT) est un tableau biologique souvent observé chez les hommes inféconds. On parle d'OAT car l'oligozoospermie est rarement isolée et souvent associée avec une asthénospermie et/ou une tératospermie (Hamamah et Barthelemy 1997). L'anamnèse révèle des antécédents infectieux d'orchite, de cryptorchidie, de cure chirurgicale d'hydrocèle ou de hernie inguinale, facteurs potentiels d'OAT. Ces antécédents sont associés cliniquement à une varicocèle possible.

L'asthénospermie est due soit à un phénomène infectieux et/ou une absence de fructose (Hamamah et Barthelemy., 1997). Les asthénospermies sont liées aussi à une auto-immunisation par anticorps, ou à une anomalie de plasma séminal, notamment une hyperviscosité due à des troubles de la liquéfaction ou encore dans les cas d'asthénospermies à moins de 10 % de mobilité normale les dyskynésies flagellaires de l'axonème ou des structures péri-axonémales mises en évidence par l'étude ultrastructurale du flagelle du spermatozoïde sont des causes possibles de cette diminution de la mobilité (Hé, 1997).

L'asthénospermie peut avoir plusieurs étiologies : d'origine testiculaire (orchite, cryptorchidie, obstruction unilatérale sur le tractus), un problème d'éjaculation (infection, varicocèle), la présence de bactéries, d'infection ou d'inflammation du tractus accompagnée ou non de leucospermie, et la présence d'auto-anticorps dans le plasma séminal ou sur la membrane plasmique des spermatozoïdes.



La valeur normale du volume du sperme doit être prise en considération car elle permet de calculer le nombre total de spermatozoïdes par éjaculat qui est un paramètre définissant une éventuelle atteinte de la spermatogenèse en fonction de la concentration observée. Un volume insuffisant peut être en soi la cause d'une infertilité même si les autres paramètres sont normaux. Les cas d'hypospermie sont peut être due soit à une perte d'une partie de l'éjaculat (Girod et Czyba, 1977) ou d'une éjaculation incomplète due à un dysfonctionnement du réflexe éjaculatoire (Robin et al., 2008), ou bien à l'insuffisance des sécrétions de l'une ou l'autre des glandes annexes (situation pouvant correspondre à une prostatite ou à une vésiculite), ou exclusion des vésicules séminales (congénitale ou acquise) où on sera en présence d'une azoospermie et le volume sera généralement inférieur à 1ml (Guérin, 1993).

Tandis que l'hyperspermie évoque la présence de lésions infectieuses des glandes annexes et en particulier les vésicules séminales, elle peut être due aussi à une abstinence sexuelle trop longue (Marmor 2007). Alors que (Guerin 1993) ne considérait pas l'hyperspermie comme une pathologie, mais témoigne seulement d'une hypersécrétion des vésicules séminales. Elle est néanmoins susceptible d'entraîner une oligospermie fictive dite de dilution alors que le nombre des spermatozoïdes n'est pas anormalement abaissé.

La tératozoospermie est associée à une OA et une A dans 25.7% et 19.5% des cas. Les tératozoospermies majeures supérieures à 90% orientent vers des causes génétiques car un certain nombre de ces sujets ont un caryotype anormal (environ 3% des cas). Dans le rare cas où la tératospermie est monomorphe, une étude en microscopie électronique permet de préciser le type d'anomalie. Les tératozoospermies polymorphes modérées 70 à 80% des cas doivent faire rechercher des étiologies infectieuses ou toxiques ou une varicocèle.

Cette étude morphologique a été codifiée et quantifiée, la plupart des laboratoires utilisent la classification de David (David et al., 1975) qui tient compte des pol spermatozoïdes. L'avènement des procréations médicalement ass : l'importance du pourcentage de formes normales dans l'éjaculat, une ntré que le 10e percentile d'hommes féconds se situait à 32 % de for et al., 1986). Il semble exister une certaine constance du profil téra le même individu pouvant laisser supposer l'existence d'un rapport entre certaines perturbations morphologiques et certaines étiologies.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

L'établissement du profil tératozoospermique d'un patient nécessite la réalisation de 3 ou 4 spermocytogrammes à trois mois d'intervalle. Il est évident que l'association de nombreuses anomalies va aggraver l'handicap fonctionnel du spermatozoïde et dans certains cas, seule la microscopie électronique permettra d'établir le diagnostic.

Si l'interprétation de la tératozoospermie, telle que la microcéphalie totale ou la présence de flagelles courts pose moins de problèmes, en revanche il n'en est pas de même lorsqu'il s'agit d'anomalies de la tête le plus souvent irrégulière. Il existe des relations significatives entre la fréquence des anomalies de gamètes et les anomalies de certains tests fonctionnels : la mobilité, le test de pénétration dans la glaire, le test de fixation sur la zone pellucide de l'ovocyte. Le taux de clivage en fécondation in vitro est nettement plus faible en cas de tératozoospermie sévère. La mobilité et la tératozoospermie sont des facteurs déterminants dans l'expression du pouvoir fécondant du sperme (Silber 1989).

La présence de varicocèle est également une anomalie fréquente, l'association exacte entre réduction de la fertilité masculine et varicocèle n'est pas connue mais des travaux de la WHO (Hamamah et Barthelemy 1997) indiquent clairement que les varicocèles sont associées à des anomalies spermatiques, une diminution du volume testiculaire et une dégradation de la fonction des cellules de Leyding. De nombreuses études ont montré un effet délétère des varicocèles sur la spermatogénèse avec en particulier une diminution de la densité des spermatozoïdes (oligozoospermie) voir une azoospermie et une diminution des formes mobiles (A), une tératozoospermie, ou une OAT (Mieusset et al., 1996). Il a été rapporté que les patients avec une varicocèle ont un nombre réduit de spermatozoïdes fonctionnels, une faible mobilité et vitalité, une faible intégrité de la membrane et de l'acrosome. Ces anomalies ne sont pas liées au grade de la varicocèle, du volume testiculaire ou de la concentration sérique de FSH (Villanueva-Diaz et al., 1999). La varicocèle compromet le système de régulation thermique du testicule. Elle est caractérisée par une stase veineuse, un stress thermique, hypoxie et l'accumulation des métabolites toxiques qui conduisent à l'élévation de production des molécules réactives qui entraînent l'apoptose durant les stades spécifiques de la spermatogénèse (Wu et al., 1999). Dans notre étude nous avons noté une prédominance de varicocèle avec 64 cas sur 76 cas soit 84.2% chez les patients avec d'autres antécédents urogénitaux avec un pourcentage de 87.5 % chez les patients sans antécédents urogénitaux et 12.5% chez l'infertilité secondaire. La varicocèle est associée avec l'OAT dans 19 cas soit 29.7%, l'AT dans 17 cas soit 26.6% et l'A dans 10 cas soit 15.6%. Ces résultats sont concordants avec la littérature où un nombre réduit



d'articles font apparaitre l'existence d'une OAT chez 25 à 65% des hommes porteurs d'une varicocèle clinique (Toure et al., 1995).

Mac Leod en 1953 (Mac Leod 1953) avait constaté une augmentation du délai de conception en fonction de l'âge masculin, sans tenir compte de l'âge de la femme. L'étude de la relation entre âge et fertilité masculine pose des problèmes méthodologiques difficiles. On ne peut, en effet, évaluer le rôle de l'âge sur la composante masculine de la fertilité des couples sans tenir compte des autres facteurs de cette fertilité, comme l'âge de la conjointe et l'évolution de la fréquence des rapports sexuels. L'étude de l'évolution des caractéristiques du sperme avec le vieillissement est l'un des moyens qui permettent d'analyser indirectement la relation entre l'âge et la fertilité de l'homme. Dans notre série nous avons noté une moyenne d'âge de $38 \pm 5,65$ ans, avec des extrêmes de 26 et 55 ans et la tranche d'âge de 36-40 ans est la plus représentée avec 37.9% des patients. Globalement le taux d'infertilité primaire est significativement plus élevée entre 26-40 ans ($p < 0.001$) par rapport à la tranche d'âge de 41-55 ans.

L'infertilité secondaire est significativement plus élevée entre 41-55 ans ($p < 0.05$) probablement car certains patients ayant une sous-fertilité auront eu plus de temps pour essayer, dans certains cas prendre de nouvelles épouses, parfois plus fertiles, car la polygamie est autorisée en Algérie. Nos résultats rejoignent ceux de la littérature (Niang et al. 2009), (Bah et al. 2007). L'âge avancé de nos patients peut s'expliquer aussi par le retard de la consultation du fait du mythe de la seule responsabilité féminine dans l'infertilité du couple. Nous avons noté un faible taux de consultation après l'âge de 45 ans. Ceci peut s'expliquer par le début de l'âge de la ménopause du conjoint, et d'autre part, la préférence des couples de concevoir des enfants avant cet âge. De plus avec l'âge le comportement se modifie, le rythme et la qualité des rapports diminuent et parfois des facteurs de mode de vie ou d'environnement interfèrent avec les paramètres précédents (Humeau 1995). La littérature rapporte plusieurs arguments qui expliquent le déclin de la fertilité avec l'âge. Une étude réalisée par Jouannet en 1983 sur 64 hommes de plus de 50

ans, a été un facteur très important d'hommes de moins de 50 ans, montre les différences de pourcentage de spermatozoïdes mobiles (55% avant 50 ans contre 32% après 50 ans), le pourcentage de formes normales (47% contre 31%), mais aussi dans la composition du sperme (46 millions contre 46 millions), différences qui sont également significatives (Jouannet 1995).



L'étude de l'évolution des caractéristiques du sperme chez les 327 patients en fonction de l'âge permet d'analyser l'impact de l'âge sur les paramètres spermatiques. L'analyse des valeurs moyennes des paramètres spermatiques n'a montré aucune variation significative avec l'âge des valeurs moyennes du volume, de la concentration et de la numération. En revanche, de manière surprenante on observe une augmentation de la mobilité avec l'âge ($p < 0.05$).

On note que ces paramètres peuvent être corrélés car dans bien des cas les anomalies morphologiques entraîneront une altération de la mobilité. On observe également une légère baisse non significative du volume spermatique avec l'âge.

Nos résultats rejoignent ceux de la littérature, Plusieurs études ont analysé l'influence de l'âge sur les caractéristiques du spermogramme chez les hommes féconds. Certaines études rapportent que les paramètres spermatiques semblent en moyenne indépendants de l'âge entre 20 et 60 ans ce qui laisse penser que la qualité de l'éjaculat est conservé jusqu'à 50 à 60 ans. Schwartz et coll. (Schwartz et al. 1983) ont comparé les valeurs moyennes de cinq paramètres : volume, concentration en spermatozoïdes, pourcentage de formes morphologiquement normales, pourcentage de formes mobiles et numération totale chez 833 hommes féconds âgés de 21-50 ans. Ils n'ont pas mis en évidence de variations significatives de ces paramètres avec l'âge. Par contre, ils ont observé des variations significatives du pourcentage de formes normales et du pourcentage de formes mobiles avec l'âge: celles-ci atteignent un maximum entre 25 et 35 ans puis décroissent chez les hommes plus âgés, ces auteurs ont montré que les anomalies morphologiques significativement observées sont les formes microcéphales avant 25 ans et flagelles enroulés après 45 ans. On souligne le biais de recrutement de notre population, le biais lié à l'étalement des valeurs observées, pour un âge donné, de tous les paramètres du sperme, le faible effectif des patients dans certaines classes d'âge peuvent expliquer l'absence de corrélation entre l'âge et les paramètres spermatiques que nous avons étudié.

Les infections, l'environnement, la génétique, les maladies et les traumatismes principales de l'infertilité masculine. De nombreuses situations nées pour avoir un risque sur la fertilité des hommes qui y sont (Cohen 1977). Nous avons noté une diminution significative de chez les groupes exposés à des risques toxiques et/ou à de fortes cha, les cuisiniers, les agriculteurs et les ouvriers par rapport aux autres groupes à moindre risque. Pour la profession de chauffeur, particulièrement exposé aux toxines environnementales, dans une étude rétrospective menée par (Thonneau et al.,

fig
pro
exp
la
cha



Optimized using
trial version
www.balesio.com

1997) sur 402 couples fertiles a noté que le temps requis pour achever une grossesse est significativement augmenté de 4,5 mois pour un groupe de conducteurs professionnels (> 3 heures /jour) contre 2,8 mois pour des hommes non exposés. Certaines études ont prouvé, chez l'homme et l'animal, que la chaleur perturbait la spermatogenèse et pouvait diminuer la fertilité masculine (Maurice. 1995). Les hommes exposés à des températures élevées constituent donc une population à risque et on a observé que les ouvriers servant les fours à céramiques présentaient une chute de la mobilité des gamètes expliquant peut-être une augmentation significative des couples sans enfants dans cette population (Maurice. 1995). Cet effet de la chaleur n'est pas retrouvé chez les patients signalant prendre des bains chauds réguliers. On peut penser que dans ce cas la durée et la fréquence d'exposition n'est pas suffisante pour altérer la gamétogénèse. Chez l'homme, certains pesticides comme le dibromochloropropane ou le dibromure d'éthylène utilisé par les agriculteurs entraînent des altérations de la spermatogenèse (Maurice. 1995) . On note que nous observons ici une diminution des paramètres spermatiques chez les agriculteurs potentiellement exposés à de nombreux toxiques.

L'association entre la consommation de la cigarette et l'altération des paramètres spermatiques a été déjà décrite. Dans la présente étude la fréquence de l'infertilité primaire est plus importante dans le groupe des non fumeurs 210 cas (54.5%) que dans le groupe des fumeurs 175cas (45.4%). Sur un total de 130 fumeurs, 90 patients (69.2%) consomment plus de 20 cigarettes par Jour (c/j) contre 40 patients (30.8%) qui consomment moins de 20 c/j. Selon une méta-analyse de 27 études portant notamment sur l'association entre le tabagisme et la qualité du sperme, il a été signalé chez les fumeurs une réduction moyenne de la concentration de spermatozoïdes de 13%, de la motilité des spermatozoïdes de 10% et de spermatozoïdes morphologiquement normaux de 3% (Pasqualotto et al., 2008). De récentes études ont montré qu'il existe un passage de la barrière hémato-testiculaire de certaines substances contenues dans la fumée de cigarette. La présence de tels composés dans le liquide séminal des fumeurs entraîne une altération des paramètres spermatiques classiques et de la qualité nucléaire des spermatozoïdes, ce qui diminue les chances de grossesse. Le stress oxydatif généré par le tabac est l'une des principales causes d'altération de la qualité des spermatozoïdes, entraînant une fragmentation de leur ADN (Trummer et al., 2002), et un changement des concentrations de testostérone et l'hormone de prolactine (Kumosani et al., 2008). De nombreuses études ont incriminé le tabac dans les troubles de l'érection ainsi que dans les altérations de la qualité spermatique notamment, en 2008 l'étude de



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Cutis et al (Curtis et al., 1997) a mis en évidence une baisse significative de la mobilité ainsi que des anomalies de numération, aucune différence significative n'a été retrouvée en ce qui concerne le volume et la qualité spermatique. Dans notre étude la liaison entre la consommation de cigarette et les paramètres spermatiques n'a pas montré une différence significative. Nos résultats concordent avec ceux de Trummer (Trummer et al., 2002) qui a montré que la consommation de la cigarette n'affecte pas les paramètres spermatiques. Nous n'avons pas lors de notre étude réalisé de test permettant de mesurer la fragmentation de l'ADN et nous ne pouvons malheureusement pas confirmer l'effet du tabac sur ce facteur. Nous collectons actuellement les résultats d'ICSI pour évaluer si le taux de grossesse est réduit chez les fumeurs, peut être du fait d'une fragmentation plus importante de l'ADN spermatique.

Les données sur l'effet de la consommation d'alcool sur la spermatogénèse sont rares, elles montrent un effet protecteur apparent de la consommation modérée sur les paramètres spermatiques probablement en raison de l'effet antioxydant de certaines boissons alcoolisées. Certaines études ont montré que la consommation d'alcool par les hommes n'était pas associée à la fécondité (Dunphy et al., 1991). Cependant, l'abus d'alcool (> 20 unités/semaine) est connu pour être associé à une hypofertilité (Hassan et Killick 2004). Nos résultats concordent avec ceux de la littérature le test de corrélation entre l'alcool et les différents paramètres spermatiques, n'a pas montré une différence significative. On note que seulement une minorité de nos patients déclare boire de l'alcool. Notre population majoritairement musulmane n'est probablement pas la population la plus appropriée pour observer un effet potentiel de l'alcool du fait que ce sujet reste un tabou et que tous nos patients ne déclarent peut-être pas leur consommation d'alcool. L'étude de la liaison entre la consommation de la cigarette et d'alcool ensemble et les paramètres spermatiques n'a pas non plus montré de différence significative. (Thonneau et Bujan. 1993) ont rapporté que l'augmentation artificielle prolongée et modérée, quelques degrés, de la température scrotal entraîne des anomalies puis un arrêt de la spermatogénèse. (Céanalysant l'effet des antécédents d'un état fébrile sur la qualité du spe qui ont vécu un ou plusieurs épisodes fébriles a trouvé que la cor atozoïdes, la morphologie et la motilité ont été sensiblement affa particulièrement pendant la période de la spermiogénèse. (Mieusset et Bu que la température affecte l'activité de plusieurs enzymes et modifie la composition lipidique de la membrane. L'étude de l'exposition à des bains



chauds n'a pas montré une grande influence due à la durée d'exposition qui n'était pas excessive.

Parmi les 123 cas ayant des antécédents familiaux, nous avons noté un pourcentage élevé d'antécédents d'infertilité de fratrie avec 62 cas soit 15.3 % suivi des antécédents de la famille avec 43 cas soit 10.6% ainsi que 18 cas ayant des antécédents de fratrie et famille soit 4.5%. La présence des antécédents familiaux peut nous orienter vers une cause génétique cela est confirmé par la notion de consanguinité qui est apparu chez 33.9% des patients ayant des antécédents de fratrie, 33.3% des patients ayant des antécédents de famille et fratrie ensemble et 7% des patients ayant des antécédents de famille. Par conséquent la recherche lors de l'interrogatoire d'éléments familiaux évocateurs d'une affection génétique doit faire partie de l'exploration de l'infertilité masculine, bien que le conseil génétique nécessite des compétences spécialisées afin de délivrer une information adéquate sur les risques dans la fratrie et la famille, de descendance, les chances de succès en cas de techniques de procréation artificielle. Le diabète est la maladie la plus représentée dans notre étude avec 5,2% (n=21 cas) suivie des maladies respiratoires et neurologiques avec 2.5% (n=10 cas), des maladies cardiovasculaires avec 1.7% (n=7 cas), 1.5% des cas ayant des maladies métaboliques.

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que ce sont des pathologies qui sont de plus en plus fréquentes dont leur traitement pourrait entraîner une diminution de la fertilité. Les anti-ulcéreux comme la cimetidine, les anti-HTA comme les bêtas bloquants, les anti diabétiques oraux.

comme les biguanides, et les anti tuberculeux comme les sulfamides ont tous un effet néfaste sur la fertilité (Pan et Campana 1997). De nombreux médicaments sont mis en cause dans les bilans d'infertilité et doivent être recherchés activement lors de l'interrogatoire. Ils peuvent être pourvoyeurs de troubles de la fonction sexuelle, d'anomalies gamétiques ou de nidation (alphanbloquants, antihypertenseurs, anabolisants stéroïdiens et testostérone chez les sportifs, antidépresseurs, antipsychotiques, etc.). De même les médicaments anti-acidité peuvent altérer la mobilité des spermatozoïdes, voire stopper la spermatogenèse (Lévesque et al., 1998; Lévesque-Ducos 2006).

Le premier cas de grossesse obtenue par ICSI (Lévesque et al., 1992) rapportent la première grossesse obtenue par l'injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte. Depuis, l'ICSI a bouleversé la prise en charge de la stérilité masculine en général, et le pronostic des insuffisances spermatiques sévères en particulier. Actuellement, l'ICSI connaît un essor si



Optimized using
trial version
www.balesio.com

rapide, elle occupe une place essentielle parmi les techniques d'AMP. Elle concerne 40-45% des ponctions réalisées en France en 1996 et 60 centres biologiques la pratiquent en France.

Les facteurs masculins sévères représentent l'indication majeurs de l'ICSI, qu'il s'agisse d'atteinte portant sur l'un des paramètres du sperme (nombre de spermatozoïdes insuffisant, mobilité abaissée, pourcentage de formes atypiques trop élevé) ou sur les trois paramètres (oligo-astheno-tératospermie sévère: OATs). La limite en-deçà de laquelle l'ICSI doit être proposée de préférence à la FIV conventionnelle reste discutée. Mais le nombre de spermatozoïdes mobiles obtenu après préparation du sperme constitue un indicateur : moins de 500 000 spermatozoïdes mobiles totaux justifie « l'option » de l'ICSI. Actuellement, la moitié des ICSI (51.2%) en France est réalisée avec du sperme très altéré (OATs), car la qualité du sperme est incompatible avec la réalisation de la FIV, et donc l'ICSI a été proposée en première intention (Parinaud 1997).

Selon l'enquête des BLEFCO 1997, le nombre moyen d'ovocytes recueillis en ICSI (10.2 par ponction) était légèrement supérieur à celui de la FIV. Environ la moitié des ovocytes injectés évoluent en embryons. Ainsi 2.7 embryons sont transférés en moyenne. Soit autant qu'en FIV.

Dans des pays différents du Nord et de l'Est de l'Europe (Denmark, Finland, Russie), la technique de FIV reste la technique dominante. En revanche, dans plusieurs pays de l'Ouest et centre de l'Europe (Allemagne, Italie, Espagne) l'ICSI est utilisé dans plus de 75% des cas. Dans notre laboratoire on utilise la technique d'ICSI en prédominance, avec un taux de fécondation de $71.6 \pm 25.2\%$. Nos résultats concordent avec ceux de (Parmegiani et al., 2010) et (Nasr-Esfahani et al., 2008) qui ont trouvé un taux aussi élevé des ovocytes fécondées avec respectivement 87.1% et 67.7%.

Selon la littérature le taux de transfert de plus de 3 embryons varie de 4.4 à 58.8%, et celui de moins de 3 embryons de 0 à 57.7%, il est de 53.4% au Norvège, 48.9% en Belgique, 48.9% en Danemark. Dans notre étude les résultats concordent avec ceux de la littérature : un taux de transfert de 3 embryons de 56.3% et un taux bas de transfert de 4.4%. La moyenne des embryons transférés est de 2.3 ± 0.8 . En France, le nombre moyen des embryons transférés en ICSI en 2008 était de 2.46. Le taux moyen de grossesse par transfert est de 26.8%, varie de 18.2 à 46.4%. Nos résultats montrent un taux élevé de grossesse par transfert de 41% et un taux de grossesse par cycle de 38.2%.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Après l'ICSI, le taux de grossesses uniques est de 73.3%, gémellaires 23.9%, triplet 2.3% et supérieur à 3 de 0.1% (Marret 2002). Dans notre étude nos résultats concordent ceux de la littérature, nous avons un taux de grossesse unique de 63.2%, gémellaire 17.6%, triplet 1.5% et des ABRT 17.6%

Les résultats d'ICSI dans les déficits spermatiques sévères sont très encourageants : le taux de grossesse par tentative est de 26% et donc légèrement supérieur malgré les carences importantes du sperme. Les facteurs masculins ne semblent pas influencer le taux de transfert. Cependant, l'âge de la patiente, le nombre et la qualité ovocytaire semble influencer le taux d'obtention d'embryons, ainsi que le taux de grossesses par transfert.

La plupart des patients ont tous les ovocytes inséminés et décident l'utilisation des embryons une fois que le nombre développé est connu. En raison des risques de grossesse multiple, y compris les complications psychologiques et physiques chez la mère et l'enfant, les couples sont maintenant invités à limiter le nombre d'embryons transférés à deux ou trois. Rarement, un couple ayant insisté sur quatre embryons transférés dans l'espoir que cela permettra d'améliorer les chances de conception. Les embryons de plus de deux ou trois sont congelés afin que le couple puisse augmenter les chances de grossesse éventuelle.

Les embryons sont décongelés et transférés le plus tôt possible si le premier transfert d'embryon échoue ou une ou plusieurs années plus tard si un deuxième enfant est voulu. Après la période d'étude, le succès de congélation est devenu connu pour les couples dans le programme.

Parmi les 1645 embryons obtenus, 831 embryons ont été transférés et 139 embryons ont été congelés, 45 patients ont décidé de congeler des embryons. La possibilité de congélation-décongélation est discutée lorsque le patient entre dans le cycle de traitement, et la décision finale concernant le nombre d'embryons à congeler décongeler est prise lorsque le nombre d'embryons normaux développé est connu. Dans la pratique, les couples avec des embryons collectés ont deux ou trois transférés immédiatement et les autres congelés. Parce que seulement environ la moitié des embryons survivent à la congélation et décongélation, généralement tous les embryons congelés sont transférés.

Le nombre d'embryons congelés-décongelés de un à quatre. Probablement certains couples vont changer leur attitude à l'utilisation d'embryons



Optimized using
trial version
www.balesio.com

congelés, en raison du divorce, de décès ou de maladie dans un partenaire ou un changement de circonstances psychosociales.

Le tabagisme chez l'homme et la femme entraîne une diminution de plus de 40 % les chances en AMP et un taux d'échec en ICSI 3 fois plus élevé chez les fumeurs (Alvarez et Fallet 2010). De plus, en FIV/ICSI le risque de ne pas aboutir à une grossesse est 4 fois plus élevé chez les fumeurs de plus de 5 ans (Alvarez et Fallet 2010). Nos résultats montrent que la plupart des patients qui fument ont des résultats négatifs 81 cas contre 67 cas qui ont des résultats positifs. Nous n'avons pas trouvé de différence significative entre la consommation de la cigarette et les résultats d'ICSI.

Dans de tels couples, l'âge de la femme est déterminant : l'attitude vis-à-vis de ces infertilités masculines n'est pas la même selon que la femme a 24 ou 36 ans ! Cependant, si l'exploration de l'homme infertile commençait le même jour que l'exploration de sa femme, il y aurait moins de pressions sur les équipes pour les demandes de PMA ! Les techniques de PMA ont incontestablement transformé depuis 15 ans le paysage de l'infertilité masculine. La complexité étiologique de l'infertilité masculine et le caractère incertain des résultats thérapeutiques obtenus tendent à décourager les couples et leurs médecins à faire face. L'exploration masculine d'un couple infertile tient dans une question qui doit être posée à la phase initiale de la demande : « A-t-on une chance raisonnable que ce couple puisse concevoir sans FIV ou sans ICSI ? ».

Le caryotype et la recherche de microdélétions du chromosome Y et des mutations *CFTR* permettent d'établir le diagnostic dans moins de 5 % des cas, tous phénotypes confondus (F Tüttelmann 2011). Ce pourcentage démontre l'implication probable d'autres gènes encore inconnus dans les différents phénotypes d'infertilité masculine. On estime qu'entre 1 500 et 2 000 gènes interviennent dans le contrôle de la spermatogenèse, parmi lesquels 300 à 600 sont spécifiquement exprimés dans les cellules germinales masculines.

On s'attend donc logiquement à ce que des anomalies de ces gènes perturbent la fertilité masculine (Tüttelmann et al. 2008). Les tests génétiques de routine (caryotype et diagnostic des microdélétions du chromosome Y) ne sont pas généralement proposés pour les patients. Tüttelmann et ses collègues ont examiné un total de 1583 patients atteints d'azoospermie et ont constaté que 14 % présentent le syndrome de Klinefelter avec des microdélétions sur chromosome Y (F Tüttelmann 2011).

Comme ces anomalies génétiques se produisent de novo ces taux ne seront pas retrouvés



Optimized using
trial version
www.balesio.com

dans notre échantillon qui représente une population spécifique. Par extrapolation, dans notre cohorte nous estimons avoir 1,6 % des patients qui présentent un Klinefelter et 0,23 % souffrant d'une microdélétion du chromosome Y.

Très récemment, l'origine génétique de deux formes de tératozoospermies sévères (anomalies morphologiques du spermatozoïde) a été identifiée : chez les patients atteints, les spermatozoïdes soit sont macrocéphales, soit présentent une tête ronde sans acrosome (globozoospermie) (Dam et al., 2007), (Koscinski et al., 2011). Au cours de cette étude nous avons identifié les deux mutations nouvellement décrites dans le gène AURKC. D'autres groupes proposent un dépistage rapide de l'exon 3 seulement pour détecter la présence de la mutation récurrente la c.144delC chez les patients ayant un phénotype monomorphe de spermatozoïdes macrocéphales. Nos résultats indiquent que l'analyse moléculaire ne doit pas s'arrêter après un dépistage négatif de l'exon 3. Nous avons réalisé Comme stratégie de diagnostic le séquençage de l'exon 3 et de l'exon 6 du gène AURKC pour tous les patients qui présentent une proportion importante de spermatozoïdes macrocéphales. Le séquençage des exons restant du gène AURKC pourrait être proposé en absence de mutation au niveau des exons 3 et 6 et ceci uniquement pour les personnes ayant une concentration de spermatozoïdes >1M et ayant moins de 1% de spermatozoïdes normaux. Les hommes non-mutés présentent normalement des formes moins sévères de la pathologie.

Dans cette population, 11 hommes présentent une mutation homozygote AURKC (2,7 %) et 5 une délétion homozygote de DPY19L2 (1,2 %). Nous pouvons donc conclure que chez les hommes algériens, et probablement plus généralement chez les hommes d'origine nord- africaine, la cause génétique la plus fréquente de l'infertilité est la macrocéphalie due à la mutation AURKC. De plus chez les hommes infertiles d'Afrique du Nord, nous nous attendons à ce que les mutations AURKC et DPY19L2 soient respectivement 10 et 5 fois plus fréquente que les microdélétions sur chromosome y.

La fréquence élevée de mutations d'AURKC retrouvée dans notre étude concorde avec nos précédemment estimé que la mutation c.144delC récurrente (homozygote) dans 1 à 50 d'Afrique du Nord (Dieterich et al., 2009). Ce résultat concorde avec l'article de Dieterich et al. avec 14 cas décrits (Dieterich et al., 2009). Harbuz et al., ont identifié 34 cas homozygotes ayant une mutation AURKC c.144delC et un phénotype typique avec un taux de spermatozoïdes macrocéphales compris entre 60 et 100 % contre 28 patients non porteurs de cette délétion et présentant un phénotype modéré avec un taux de spermatozoïdes macrocéphales



Optimized using
trial version
www.balesio.com

compris entre 5 et 75 % (Harbuz et al., 2009). La fréquence des mutations d'AURKC des patients atteints de macrocéphalie dans notre cohorte représente 78,5 % (11/14). La variante c.144delC représente 91 % des allèles mutés. Nous avons observé la nouvelle mutation non-sens p.Y248 * décrite par (Ben Khelifa et al., 2012) qui représente le reste (9 %). Nos résultats sont concordant avec ceux de (Ben Khelifa et al., 2012) qui ont identifié cette nouvelle mutation non-sens, p.Y248 *, dans 10 individus non apparentés de l'Europe (n = 4) et d'origine nord-africain (n = 6). Cette nouvelle variante représente 13% de l'ensemble des allèles mutants et la variante c.144delC initialement décrite représente la quasi totalité des allèles mutés restants (85,5%).

La fréquence élevée de mutation est surprenante, lorsque cette mutation est présente dans un état homozygote elle induit un handicap en matière de reproduction. L'accumulation de mutations récurrentes dans la population maghrébine pourrait s'expliquer par un avantage sélectif pour les porteurs de mutations AURKC hétérozygotes. Cela pourrait s'expliquer par le rôle que joue AURKC dans le point de contrôle de l'assemblage du fuseau (SAC) : lors de la méiose, cellules germinales avec chromosomes alignés ou tension anormale des microtubules qui se traduirait par une mauvaise ségrégation, sont bloqués dans la prométaphase. Il ya un nombre croissant de preuves indiquant que AURKC pourrait jouer un rôle important dans le SAC. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les hommes avec les mutations AURKC hétérozygotes pourraient avoir un SAC accéléré permettant un changement rapide de la méiose conduisant à une augmentation de la production de sperme. Cela pourrait donner à ces hommes un avantage reproductif léger expliquant la forte prévalence des allèles mutés. Les gamètes produits seraient toutefois capables de présenter un taux des aneuploïdies susceptibles d'induire un taux élevé d'avortements spontanés.

Nous avons souhaité vérifier cette théorie, mais nous étions confrontés au problème des donneurs hétérozygotes. Nous notons que dans deux cas, les patients ont signalé que leurs parents ont eu plusieurs avortements spontanés. Comme le père et la mère sont

por
gan



présentent probablement un risque plus élevé de la production de

dér



DL2 était également fréquente dans notre cohorte. Nous avons

dér que ces suppressions ont eu lieu par NAHR entre deux homologues LCK Z8 Ko situés de chaque côté du gène (Harbuz et al., 2011). De nouvelles mutations sont donc relativement fréquentes et nous avons estimé que la fréquence de novo

délétion était d'environ $1,5 \times 10^{-5}$ par méiose indépendamment de l'origine des individus (Coutton et al. 2013). L'incidence plus élevée de la globozoospermie observée chez les hommes d'Afrique du Nord n'est donc pas le résultat d'une augmentation de la fréquence allélique (comme observé pour AURKC), mais à un taux de mariages intrafamiliaux spécifiques à cette population qui est très favorable à l'émergence de traits récessifs supérieurs et cela est prouvé par le cas familial des 3 frères ayant la mutation DPY19L2. Le mariage consanguin des grands-parents, et des parents qui étaient cousins au premier degré, a indiqué que l'anomalie génétique a été transmise comme un trouble autosomique récessif. Le spermogramme de ces patients montre une numération et une mobilité spermatique en général normale, associée à une altération majeure de la morphologie. Pour notre échantillon la plupart avaient une numération normale et une mobilité anormale < 50%.

Une sélection rigoureuse par Motile Sperm Organelle Morphology Examination (MSOME) a déjà été appliquée pour sélectionner les spermatozoïdes apparents plus normaux dans les patients mutés AURKC c.144delC (Chelli et al. 2010). Dans cette étude seulement six spermatozoïdes normaux prospectifs ont été sélectionnés et une analyse de FISH a été réalisée sur ces spermatozoïdes. Tous les six étaient aneuploïdes confirmant que l'ICSI ne devrait pas être tentée pour les patients AURKC mutés, même après une sélection morphologique très approfondie (Chelli et al. 2010). Dans cette étude l'ICSI a été tentée pour 3 patients délétés homozygotes. La microinjection pourrait être réalisée dans deux cas (M7 et M15) mais aucun embryon transférable n'a pu être obtenu. Les trois patients sans mutation AURKC présentaient un phénotype plus léger avec < 75 % de spermatozoïdes macrocéphales alors que tous les hommes mutés ont montré un taux > 95 % de spermatozoïdes macrocéphales). Deux patients sans mutation AURKC (M8 et M12) ont bénéficié de l'ICSI. La microinjection était possible dans chaque cas et une grossesse a été obtenue pour un patient. Ces résultats confirment la pertinence du diagnostic moléculaire et le fait que l'ICSI peut être tentée pour les patients non mutés. Ce faible taux de fécondation est probablement associé à l'incidence élevée d'anomalies chromosomiques précédemment. Selon la littérature, des injections intracytoplasmiques ont été tentées pour des couples dont les hommes présentent dans leur spermogramme une proportion élevée de spermatozoïdes macrocéphales associées à des anomalies multiples. Elles ont permis d'obtenir des grossesses, mais avec des taux de fécondation et de grossesses (9,1%) inférieurs à ceux obtenus chez les couples dont l'homme présente une tératospermie polymorphe d'importance équivalente (40%)



Optimized using
trial version
www.balesio.com

(Kahraman et al. 1999).

Dans notre cohorte nous avons identifié sept patients avec un phénotype globozoospermic : quatre hommes indépendants et trois frères, tous avaient plus de 90 % de spermatozoïdes à tête ronde. Une analyse génétique ne peut être effectuée que sur les trois frères et deux autres patients. Tous ont montré une délétion DPY19L2 homozygote. Plusieurs tentatives d'ICSI ont été faites. Dans chaque cas, nous avons observé 100 % d'échec de fécondation à l'exception du patient G6, qui a obtenu une grossesse gémellaire sur la première tentative d'ICSI. Nous notons que le patient G6 présente le plus faible taux de spermatozoïdes globocéphales suggérant qu'il pourrait être porteur d'une faible mutation ponctuelle DPY19L2 ou une mutation sur un autre gène.

L'ICSI est aussi la seule option possible pour les patients globozoospermiques. Il n'y a pas d'anomalies chromosomiques bruts observés dans les spermatozoïdes globocéphales mais la fécondation et le taux de grossesse sont très faibles (Dam et al. 2007), (Sahu et al., 2010), (Liu et al. 1995). Des travaux récents suggèrent que le faible taux de fécondation observé avec des spermatozoïdes globocéphales est au moins en partie causé par l'absence ou la diminution de PLCzeta dans le sperme globocéphale. Cette protéine est nécessaire à l'induction d'oscillations de calcium déclenchant l'activation de l'ovocyte (Yoon et al. 2008), (Heytens et al., 2009). L'activation de l'ovocyte artificielle (AOA) peut être obtenue par incubation de celui ci avec le calcium ionophore et son utilisation semble améliorer le clivage et le développement embryonnaire, bien que des grossesses rares sont arrivées à terme en absence de cette AOA (Kuentz et al. 2013). Ce traitement a déjà été utilisé avec succès, ce qui améliore considérablement les taux de fécondation et de grossesse chez les patients déficients pour l'activation de l'ovocyte, y compris les patients globozoospermiques (Björn Heindryckx et al. 2008), (Heindryckx et al. 2005). Il serait très intéressant de voir, dans une cohorte plus importante de patients globozoospermiques, si l'activation du calcium ionophore permettrait un taux de grossesse meilleure et s'il existe entre la présence d'une mutation dans le gène DPY19L2 ou le taux de grossesse. Nous avons déjà réalisé deux tentatives d'ICSI en utilisant le calcium ionophore pour l'activation ovocytaire pour deux patients ayant la même mutation. Nous avons obtenu des taux de fécondation très élevés et très élevés. Une grossesse n'a été obtenue cela pourrait être lié à un problème chez la conjointe. Cette technique est réalisée pour la première fois lors de notre étude dans la



Optimized using
trial version
www.balesio.com

clinique et elle va être appliquée pour une cohorte importante de patients globozoospemiques.

Nous avons réalisé une comparaison entre la technique d'MLPA et PCR longue duplex en utilisant des patients de contrôle négatif. La PCR duplex indique que les patients délétés homozygotes sont bien délétés, ayant les 2 bandes de RYR1 et de DPY19L2 cette bande indique l'amplification des 2 régions LCR1 et LCR2 et par la suite l'absence de DPY19L2 (Figure. 19) et les patients non délétés en MLPA n'ayant aucune mutation en PCR longue duplex.

MLPA est moins sensible à la fragmentation de l'ADN que d'autres PCR longue ou autres techniques de dosage de gène (Kozlowski et al., 2007). Une amplification par PCR longue permettant l'amplification à travers la région délétée (Koscinski et al., 2011). Une telle approche, associée à l'amplification spécifique de l'exon permet la détection de délétions hétérozygotes. Un résultat négatif, cependant, ne peut être obtenu que si les points de rupture se situent en dehors de la région couverte par les amorces spécifiques de suppression. MLPA ne présente pas cet inconvénient et permet la détection de la suppression de n'importe quel ensemble DPY19L2 codage de la séquence, indépendamment de la localisation des points d'arrêt. Pour le diagnostic de la globozoospermie, nous recommandons donc de lancer le diagnostic moléculaire par DPY19L2 MLPA pour identifier tous les patients délétés homo et hétérozygotes.



CONCLUSION



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Avec l'augmentation de l'incidence d'infertilité masculine et la diminution de la spermatogénèse au cours de ces dernières décennies, la santé reproductive de l'homme est devenue un sujet de santé publique. Notre contribution à l'étude des infertilités masculines dans une population de l'Est Algérien, avait pour but d'aborder l'aspect épidémiologique, cytologique et génétique afin de cerner les causes de cette pathologie, évaluer la fréquence des anomalies spermatiques, orienter la recherche étiologique, par la même recenser les facteurs de risque majeurs pour une meilleure prise en charge. En effet, Notre étude nous a permis de trouver une fréquence de spermogramme et/ou un spermocytogramme pathologique de 83.3% avec une prédominance de l'oligo-asthéo-téatospermie (OAT).

Cette étude montre un effet modéré des facteurs de risque environnementaux et comportementaux sur les paramètres du sperme. L'exposition à la chaleur et aux toxines semble être le facteur le plus délétère pour la spermatogénèse. Nous n'avons pas observé d'effets néfastes de l'alcool et du tabac. En revanche, on observe une diminution significative dans la numération des sujets exposés à une forte chaleur et / ou des inhalations toxiques. Cette étude confirme que certains facteurs environnementaux et comportementaux peuvent changer les paramètres du sperme et donc conduire à une baisse de la fécondité. L'interrogatoire du couple, l'examen clinique et le spermogramme sont les éléments incontournables du bilan de l'infertilité masculine. Ils orientent les examens complémentaires qui vont permettre d'identifier une ou plusieurs causes d'infertilité et ainsi d'adapter le traitement de manière spécifique.

Concernant la prise en charge de l'infertilité masculine, il est bien connu que la causalité multifactorielle est impliquée dans l'infertilité masculine, indiquant que l'infertilité chez un homme résulte d'interactions entre plusieurs facteurs, à savoir son patrimoine génétique, son style de vie, ses expositions environnementales et/ou professionnelles à des agents toxiques ainsi que la présence éventuelle d'anomalies ou de pathologies acquises de son appareil reproducteur. Le recours à la PMA a connu un grand essor ces dernières années. Pour résoudre les problèmes d'infertilité, plusieurs études ont tenté de faire la corrélation entre les différents facteurs de risque et les résultats de la PMA. L'absence de données de suivi des couples ayant recours à la PMA, ce qui n'était pas possible dans notre étude, souligne l'importance de la prise en charge préconçue des couples avant de candidater pour la FIV, cela souligne l'importance de la prise en charge préconçue des couples avant de candidater pour la FIV, nous avons noté un taux très important de fécondation de $71.6 \pm 25.2\%$ et un taux de grossesse par cycle soit 38.2% et un taux de grossesse par transfert soit 41% .



Très peu de travaux se sont intéressés à la recherche des mutations des gènes AURKC et DPY19L2 chez les hommes infertiles dans les différentes populations. En Algérie, nous confirmons par cette étude l'intérêt de réaliser une recherche de la mutation récurrente c.144delC dans les infertilités masculines avec un pourcentage élevé de spermatozoïdes macrocéphales dépassant les 75%. Il s'agit d'une analyse moléculaire simple, fiable, rapide et peu coûteuse, qui permet d'épargner à de nombreux couples infertiles des dépenses inutiles et la succession d'échecs en cas de recours à la PMA.

Nous avons identifié un total de 26 hommes souffrant de macrocéphalie et globozoospermie, ce qui représente 6.5% du spermogramme pathologique analysé (y compris azoospermie). Cette étude a confirmé le caractère récurrent des deux mutations AURKC et de la délétion DPY19L2 chez les hommes infertiles de notre échantillon. Nous avons observé que la macrocéphalie est 2 à 3 fois plus fréquente que la globozoospermie. Nos résultats confirment que l'ICSI ne peut pas être efficace pour les patients atteints d'une mutation homozygote AURKC. Cela souligne l'importance du diagnostic moléculaire d'AURKC pour limiter les tentatives d'ICSI inutiles. Le pronostic pour les hommes non - mutés, présentant avec les formes légères de la pathologie, est plus ouvert. Pour ces hommes, nous recommandons d'effectuer une analyse par FISH sur spermatozoïdes pour estimer le taux d'aneuploïdie des spermatozoïdes. Pour les patients ayant la globozoospermie, même si le diagnostic moléculaire n'influence pas le choix du traitement chez les patients, il est important pour le conseil génétique adéquat des couples avec cette forme rare d'infertilité masculine. Certains centres encouragent l'utilisation de l'AOA, indépendamment du statut DPY19L2. Nous préconisons la prudence que les effets potentiels à long terme de l'AOA n'ont pas été étudiés jusqu'à présent. Ce travail souligne l'importance du diagnostic d'AURKC et DPY19L2 en Afrique du Nord ainsi que dans la population de l'Est Algérien, la fréquence des mutations dans ces deux gènes semble être supérieure à celle de microdélétion du chromosome Y.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Optimized using
trial version
www.balesio.com

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afoutou J.M. 1984.** Les normes du spermogramme et du spermocytogramme en milieu Africain. Exposé de titres et travaux pour M.C.
- Alexandre C. 1981.** Stérilités masculines. *EMC, Paris*, Gynécologie édition.
- Alvarez, S., et C. Fallet. 2010.** Le rôle des facteurs toxiques dans la fertilité du couple. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, Hors-série 1: Selective Art Today La PMA sélective aujourd'hui, 39 (1, Supplement 1): 39-40.
- Auger, J., F. Eustache, et G. David. 2000.** Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie* 10 (4): 358-73.
- Baccetti, B, M G Selmi, et P Soldani. 1984.** Morphogenesis of "Decapitated" Spermatozoa in a Man. *Journal of Reproduction and Fertility* 70 (2): 395-97.
- Bah, Oumar Raphiou, Abdoulaye Bobo Diallo, Alimou Diallo, Sékou Guirassy, Ibrahima Bah, Macka Barry, et Mamadou Bobo Diallo. 2007.** Infertilité masculine: Fréquence et aspects étiologiques au service d'Urologie-Andrologie du CHU de Conakry. *Andrologie* 17 (3): 241-45.
- Bakonde bakoe. 1983.** Contribution à l'étude de la stérilité masculine. Thèse Med, Dakar.
- Barthelemy C. 2003.** Indications de la recherche des anticorps anti spermatozoïdes. *Andrologie* 13: 70-80.
- Ben Khelifa, Mariem, Charles Coutton, Michael G B Blum, Farid Abada, Radu Harbuz, Raoudha Zouari, Agnès Guichet, et al. 2012.** Identification of a New Recurrent Aurora Kinase C Mutation in Both European and African Men with Macrozoospermia. *Human Reproduction (Oxford, England)* 27 (11): 3337-46.
- Bouzekrini M. 2012.** 19e congrès de la Safec. Alger.
- Brzakowski, M., E. Lourdel, R. Cabry, M.-F. Oliéric, C. Claeys, A. Devaux, H. Copin, et P. Merviel. 2009.** Épidémiologie du couple infertile. *Journal de Gynécologie et de la Reproduction* 38 (janvier): F3-7.
- Carls, N. Keiding, et N. E. Skakkebaek. 1992.** Evidence for spermatozoa in semen during past 50 years. *BMJ : British Medical Journal* 305
- Chelli, Martine Albert, Pierre F Ray, Bruno Guthauser, Vincent Izard, Ibrahim Hammoud, Jacqueline Selva, et François Vialard. 2010.** Can



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection Be Used to Select Normal-Sized Sperm Heads in Infertile Patients with Macrocephalic Sperm Head Syndrome?. *Fertility and Sterility* 93 (4): 1347.e1-5.

Cohen J. 1977. *Les stérilités et hypofertilités masculines*. Paris, Masson. Vol. 13-15, 27-35, 45-46, 49, 51-60, 63, 66, 69-80, 123-124.

Commenges-Ducos, M. 2006. Prise en compte clinique des différents toxiques dans les infertilités. In *Gynécologie obstétrique & fertilité*, 34:985-89. Elsevier.

Coulibaly A. Oumar. 2000. Caractéristiques cytospermiologiques de la stérilité masculine à propos de 598 examens. Thèse Méd, Bamako.

Coutton, Charles, Farid Abada, Thomas Karaouzene, Damien Sanlaville, Véronique Satre, Joël Lunardi, Pierre-Simon Jouk, Christophe Arnoult, Nicolas Thierry-Mieg, et Pierre F. Ray. 2013. Fine Characterisation of a Recombination Hotspot at the DPY19L2 Locus and Resolution of the Paradoxical Excess of Duplications over Deletions in the General Population. *PLoS Genet* 9 (3)

Coutton, Charles, Raoudha Zouari, Farid Abada, Mariem Ben Khelifa, Ghaya Merdassi, Chema Triki, Denise Escalier, et al. 2012. MLPA and Sequence Analysis of DPY19L2 Reveals Point Mutations Causing Globozoospermia. *Human Reproduction (Oxford, England)* 27 (8): 2549-58.

Curtis, Kathryn M., David A. Savitz, et Tye E. Arbuckle. 1997. Effects of Cigarette Smoking, Caffeine Consumption, and Alcohol Intake on Fecundability. *American Journal of Epidemiology* 146 (1): 32-41.

Dam AH, Koscinski I, Kremer JA, Moutou C, Jaeger AS et al. 2007. Homozygous mutation in SPATA 16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet*, 81(4): 813-20.

Daroui Mokaddem H. 2001. Exploration cytologique et biochimique dans l'hypoinfertilité masculine. Thèse de magistère en biochimie appliquée. Faculté des sciences de la Université d'Annaba, Algérie.

David



Optimized using
trial version
www.balesio.com

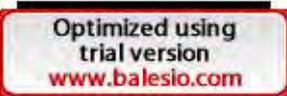
ck F., Jouannet P., Gernigon C. 1975. Anomalies permatozoïde humain. Proposition pour un système de . *Obst., Biol., Reprod* 4: 37-86.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis CV, Bergues, et U, Hennebicq S, et al. 2002.** Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod* 17: 292-98.
- Dieterich, Klaus, Ricardo Soto Rifo, Anne Karen Faure, Sylviane Hennebicq, Baha Ben Amar, Mohamed Zahi, Julia Perrin, et al. 2007.** Homozygous Mutation of AURKC Yields Large-Headed Polyploid Spermatozoa and Causes Male Infertility. *Nature Genetics* 39 (5): 661-65.
- Dieterich, Klaus, Raoudha Zouari, Radu Harbuz, François Vialard, Delphine Martinez, Hanane Bellayou, Nadia Prisant, et al. 2009.** The Aurora Kinase C c.144delC Mutation Causes Meiosis I Arrest in Men and Is Frequent in the North African Population. *Human Molecular Genetics* 18 (7): 1301-9.
- Dunphy, B C, C L Barratt, et I D Cooke. 1991.** Male Alcohol Consumption and Fecundity in Couples Attending an Infertility Clinic. *Andrologia* 23 (3): 219-21.
- Escalier, D. 1983.** Human Spermatozoa with Large Heads and Multiple Flagella: A Quantitative Ultrastructural Study of 6 Cases. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 48 (1): 65-74.
- Farih, Drs A. Khallouk, MF. Tazi*, MJ. EL Fassi, MH. 2010.** L'infertilité masculine : physiopathologie, bilan et prise en charge. *espérance médicale. urologie* 17 (juillet): 170.
- Fellous M., Siffroi J.P. 2003.** Génétique de l'infertilité chez l'homme, nouvelles approches. 13: 148-57.
- Feneux D., Ducot B., Jeulin C., Serres C., Spira A., Jouannet P. 1986.** *Caractéristiques du sperme des hommes féconds et inféconds - Similitudes et différences. In Recherches récentes sur l'épidémiologie de la Fertilité, HENRI-SUCHET., MINTZ M., SPIRA A (ed).* Paris, Masson.
- Fernandez H., Ville Y. 1989.** Prévention de la stérilité. 84: 271-78.
- Freou P. Barrière. 2010.** L'exploration de l'homme du couple *Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 39 (8):
- Gueri me normal. La Revue du praticien** 43 (8): 932-35.
- Gueri sonnable devant une infertilité masculine. Journées pyrénéennes de gynécologie, Tarbes. Paris,.**



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Guichaoua, M.-R., C. Geoffroy-Siraudin, G. Mercier, V. Achard, O. Paulmyer-Lacroix, et C. Metzler-Guillemain. 2009.** Aspects génétiques de la tératozoospermie. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité* 37 (6): 540-45.
- Hamamah S, Barthelemy C. 1997.** Spermogramme et tests de fécondance : intérêt et limites.
- Hammamah S., Saliba E., Benhamed M., Gold F. 1999.** Médecine et biologie de la reproduction. Ed Masson, 3-50.
- Harbuz Radu, Raoudha Zouari, Virginie Pierre, Mariem Ben Khelifa, Mahmoud Kharouf, Charles Coutton, Ghaya Merdassi, et al. 2011.** A Recurrent Deletion of DPY19L2 Causes Infertility in Man by Blocking Sperm Head Elongation and Acrosome Formation. *American Journal of Human Genetics* 88 (3): 351-61.
- Harbuz, R, R Zouari, K Dieterich, Y Nikas, J Lunardi, S Hennebicq, et P-F Ray. 2009.** Function of aurora kinase C (AURKC) in human reproduction. *Gynécologie, obstétrique and fertilité* 37 (6): 546-51.
- Hassan, Mohamed A M, et Stephen R Killick. 2004.** Negative Lifestyle Is Associated with a Significant Reduction in Fecundity . *Fertility and Sterility* 81 (2): 384-92.
- Heindryckx, B., J. Van der Elst, P. De Sutter, et M. Dhont. 2005.** Treatment Option for Sperm- or Oocyte-Related Fertilization Failure: Assisted Oocyte Activation Following Diagnostic Heterologous ICSI. *Human Reproduction* 20 (8): 2237-41.
- Heindryckx, Björn, Stefanie De Gheselle, Jan Gerris, Marc Dhont, et Petra De Sutter. 2008.** Efficiency of assisted oocyte activation as a solution for failed intracytoplasmic sperm injection. *Reproductive BioMedicine Online* 17 (5): 662-68.
- Heytens E, Parrington J, Coward K, Young C, Lambrecht S, et al. 2009.** Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum. Reprod* 24: 2417-28.
- Honigberg, L, et C Kenyon. 2000.** Establishment of Left/right Asymmetry in Neuroblast
0/DCC, UNC-73/Trio and DPY-19 Proteins in C. Elegans. *Development* (London, England) 127 (21): 4655-68.
- Hume**  e vieillit-il ? effet de l'âge sur la fécondance. *Les XXIIIe Journées
ies en gynécologie, obstétrique, PMA et pédiatrie.*
- Ikech**  **Orie EF, Ikegwuonu SO. 2003.** High prevalence of male infertility in southeastern Nigeria. *J Obstet Gynaecol* 23: 657-59.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Jockenhovel F. 2004.** Male hypogonadism, Uni-Med Science édition.
- Jørgensen, Niels, Anne-Grethe Andersen, Florence Eustache, D. Stewart Irvine, Jyrki Suominen, Jørgen Holm Petersen, Anders Nyboe Andersen, et al. 2001.** Regional Differences in Semen Quality in Europe. *Human Reproduction* 16 (5): 1012-19..
- J. Schlosser, I. Nakib, F. Carré-Pigeon, F. Staerman. 2006.** Infertilité masculine : bilan, *Annales d'urologie*, 40: 349-54.
- Kahraman, S., C. Akarsu, G. Cengiz, K. Dirican, E. Sözen, Belgin Can, Cengiz Güven, et P. Vanderzwalmen. 1999.** Fertility of Ejaculated and Testicular Megalohead Spermatozoa with Intracytoplasmic Sperm Injection. *Human Reproduction* 14 (3): 726-30.
- Kaufmann RB, Spitz AM, Strauss LT, et al. 1998.** The decline in US teen pregnancy rate. *Pediatrics* 102: 1141-47.
- Koikana Chacka. 1998.** Infécondité conjugale dans le service de gynéco-obstétrique du centre de santé de référence de la commune V (A propos de 518 cas). Thèse Med, Bamako.
- Koscinski, Isabelle, Elias ElInati, Camille Fossard, Claire Redin, Jean Muller, Juan Velez de la Calle, Francoise Schmitt, et al. 2011.** DPY19L2 Deletion as a Major Cause of Globozoospermia. *American Journal of Human Genetics* 88 (3): 344-50.
- Kuentz, P., F. Vanden Meerschaut, E. ElInati, M. H. Nasr-Esfahani, T. Gurgan, N. Iqbal, F. Carré-Pigeon, et al. 2013.** Assisted Oocyte Activation Overcomes Fertilization Failure in Globozoospermic Patients regardless of the DPY19L2 Status. *Human Reproduction*, février,
- Kumosani, T A, M F Elshal, A A Al-Jonaid, et H S Abduljabar. 2008.** The Influence of Smoking on Semen Quality, Seminal Microelements and Ca²⁺-ATPase Activity among Infertile and Fertile Men. *Clinical Biochemistry* 41 (14-15): 1199-1203.
- Lander, E S, et D Botstein. 1987.** Homozygosity Mapping: A Way to Map Human Recombining Traits with the DNA of Inbred Children. *Science (New York, N.Y.)* 236
- Langr... 2008.** *...ement normal et pathologique.* Edition Masson. Embryologie
- Le G... 2008.** Obesity and reproduction: a literature review. *Gynecologie, obstétrique & fertilité* 36 (5): 543-50.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Liu, J, Z Nagy, H Joris, H Tournaye, P Devroey, et A Van Steirteghem. 1995.** Successful Fertilization and Establishment of Pregnancies after Intracytoplasmic Sperm Injection in Patients with Globozoospermia. *Human Reproduction (Oxford, England)* 10 (3): 626-29.
- MacLeod J. Gold RZ. 1953.** The male factor in fertility and infertility. VII: Semen quality in relation to age and sexual activity. *fertility and sterility* 4: 197-207.
- Mansat A. et Bennet P. 1986.** *Techniques d'examen du sperme*. Stage de formation. Toulouse. France.: Laboratoire de biologie de reproduction du CECOS Midi-Pyrénées.
- Marret H, Guerif F, Royère D, Lansac J. 2002.** Actualités en procréation médicale assistée. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*. 5-A-02.
- Matzuk, Martin M., et Dolores J. Lamb. 2008.** The Biology of Infertility: Research Advances and Clinical Challenges. *Nature Medicine* 14 (11): 1197-1213.
- Maurice Auroux Emmanuel Dulioust. 1995.** Environnement, spermatozoïdes et descendance. *Medecine/science* 11: 571-77.
- Mbacker F. 1984.** Essai de détermination des normes du spermogramme et du spermocytogramme en milieu africain sénégalais. Thèse Méd, Dakar.
- Meschede D, Dworniczak B, Behre HM, Kliesch S, Claustres M et al. 1997.** CFTR gene mutations in men with bilateral ejaculatory- duct obstruction and anomalies of the seminal vesicles. *Am J Genet* 61: 1200-1202.
- Mieusset, R., L. Bujan, M. Daudin, G. Massat, A. Mansat, et F. Pontonnier. 1996.** Approche clinique d'une OAT. *Andrologie* 6 (2): 154-63.
- Nasr-Esfahani, M. H., S. Razavi, A. A. Vahdati, F. Fathi, et M. Tavalae. 2008.** Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 25 (5): 197-203.
- Nazzal N. 2002.** Approche biologique et thérapeutique d'infertilité masculine. Thèse de doctorat en médecine. Faculté de médecine. Université d'Annaba, Algérie.
- Niang You, M. Jalloh, R. Kane, J. J. Diaw, A. Ndiaye, et S. M. 2008.** Étude épidémiologique et clinique de l'infertilité masculine à l'hôpital de Fatick, Sénégal: à propos de 492 cas. *Andrologie* 19 (2): 103-7.
- Nistal A. et Herruzo. 1977.** Multi-Tailed Spermatozoa in a Case with Teratospermia. *Virchows Archiv. B: Cell Pathology* 26 (2): 111-18.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Palermo, G., H. Joris, P. Devroey, et A. C. Van Steirteghem. 1992.** Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, Originally published as Volume 2, Issue 8810, 340 (8810): 17-18.
- Pan, R. C. Martin-Du, et A. Campana. 1997.** Etiologie de 350 cas de stérilité masculine. Effet de divers traitements sur la qualité du sperme et analyse de leur rôle dans la survenue de 100 grossesses. *Andrologie* 7 (2): 199-211.
- Parinaud, J. 1997.** Pratique de l'ICSI en France : données de l'enquête BLEFCO. In *Contraception, fertilité, sexualité*, 25:602-6. Contraception, fertilité, sexualité.
- Parmegiani, Lodovico, Graciela Estela Cognigni, Walter Ciampaglia, Patrizia Pocognoli, Francesca Marchi, et Marco Filicori. 2010.** Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 27 (1): 13-16.
- Pasqualotto, Fábio Firmbach, Fernanda Medeiros Umezu, Mirian Salvador, Edson Borges, Bernardo Passos Sobreiro, et Eleonora Bedin Pasqualotto. 2008.** Effect of Cigarette Smoking on Antioxidant Levels and Presence of Leukocytospermia in Infertile Men: A Prospective Study. *Fertility and Sterility* 90 (2): 278-83.
- Pearce D, Cantisani G, Laihonon A. 1999.** Changes in fertility and family sizes in Europe. *Popul Trends* 95: 33-40.
- Perrin A, Morel F, Colleu D, Amice V, De Breakeleer M. 2008.** Study of aneuploidy in large-headed, multiple-tailed spermatozoa: case report and review of the litterature. *Fertil Steril* 90: 1201.e13-17.
- Peter J. 1991.** *Fécondation. L'obstétrique actuelle*. Printed in France PSR.
- Pontonnier F. et Bujan L. 1993.** Comment reconnaître et classer une infécondité masculine?. *Rev. Prat* 8 (43): 941-47.
- Rouvière H , Delmas A. 1992.** Anatomie humaine, descriptive topographique et fonctionnelle. In , Masson. Vol. 564-96.
- Rowe argreave TB, Mahmoud AM. 2000.** WHO manual for the ation, diagnosis and management of the infertile *iversity Press*.
- Sahu, rhal. 2010.** Successful Pregnancy in Globozoospermia with spermia after ICSI. *Journal of Obstetrics and Gynaecology: The Journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology* 30 (8): 869-70.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Schlossera J, Nakibb I, Carré-Pigeonb F, Staermana F. 2007. Infertilité masculine : définition et physiopathologie . *Ann Urol* 41: 127-33.

Schlosser J, Nakib I, Carré-Pigeon F, Stearman F. 2007. Infertilité masculine: stratégie de prise en charge. *EMC Urologie* 12: 18-760 - A - .

Schouten, Jan P., Cathal J. McElgunn, Raymond Waaijer, Danny Zwijnenburg, Filip Diepvens, et Gerard Pals. 2002. Relative Quantification of 40 Nucleic Acid Sequences by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Nucleic Acids Research* 30 (12): e57-e57.

Schwartz, D, M J Mayaux, A Spira, M L Moscato, P Jouannet, F Czyglik, et G David. 1983. Semen Characteristics as a Function of Age in 833 Fertile Men. *Fertility and Sterility* 39 (4): 530-35.

Sen, C. G. Schirren, A. F. Holstein, et C. Schirren. 1971. Über Die Morphogenese Rundköpfiger Spermatozoen Des Menschen. *Andrologia* 3 (3): 117-25.

Sharlip, Ira D, Jonathan P Jarow, Arnold M Belker, Larry I Lipshultz, Mark Sigman, Anthony J Thomas, Peter N Schlegel, et al. 2002. Best Practice Policies for Male Infertility. *Fertility and Sterility* 77 (5): 873-82.

Sharpe, Richard M, et Stephen Franks. 2002. Environment, Lifestyle and Infertility--an Inter-Generational Issue. *Nature Cell Biology* 4 Suppl (octobre): s33-40.

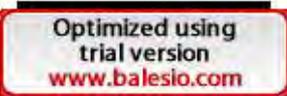
Silber, Sheman J. 1989. OPINION: The Relationship of Abnormal Semen Parameters to Male Fertility. *Human Reproduction* 4 (8): 947-53.

Staerman F, Hermabessiere J. 1993a. Guide pratique de l'infertilité masculine. *Progrès en Urologie, monographie.*

Stankiewicz, Pawel, et James R Lupski. 2010. Structural Variation in the Human Genome and Its Role in Disease. *Annual Review of Medicine* 61: 437-55.

Thonneau, P., B. Ducot, L. Bujan, R. Mieusset, et A. Spira. 1997. Effect of Male Occupational Heat Exposure on Time to Pregnancy. *International Journal of* 4-78.

Thon  **1993.** Epidémiologie de l'infécondité masculine. *Rev. Prat.* 8 (43):

Thon  **Talleg A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. 1991.** Incidence fertility in a resident population (1850000) of three French regions (1988-1989). In , 811-6:6.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Tiepolo L, et O Zuffardi. 1976.** Localization of Factors Controlling Spermatogenesis in the Nonfluorescent Portion of the Human Y Chromosome Long Arm. *Human Genetics* 34 (2): 119-24.
- Toure A, Traore M, Zubowa I. 1995.** Aspects cytospermiologiques de la stérilité masculine. *Revue Malienne de Sciences et Technologie*, 2:5.
- Trummer, Harald, Helga Habermann, Josef Haas, et Karl Pummer. 2002.** The Impact of Cigarette Smoking on Human Semen Parameters and Hormones. *Human Reproduction (Oxford, England)* 17 (6): 1554-59.
- Turek PJ, Pera RA. 2002.** Current and future genetic screening of male infertility. 29: 767-92.
- Tüttelmann F. Werny. 2011.** Clinical experience with azoospermia: aetiology and chances for spermatozoa detection upon biopsy. *International journal of andrology* 34 (4): 291-98.
- Vacheret N. 2005.** Histologie fonctionnelle des organes. Consulté le septembre 8.
- Valeri A, Joulin V, Fournier G. 1998.** Prostatites. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris)*.
- Vialard F., et R. Boudjenah. 2010.** Une altération génétique peut-elle être à l'origine d'une infertilité masculine et féminine ?. *Andrologie* 20 (2): 120-22.
- Villanueva-Diaz, C. A., E. A. Vega-Hernandez, M. A. Diaz-Perez, M. Echavarría-Sánchez, et S. Karchmer-Krivitsky. 1999.** Sperm Dysfunction in Subfertile Patients with Varicocele and Marginal Semen Analysis. *Andrologia* 31 (5): 263-67.
- Wood, C, B Downing, A Trounson, et P Rogers. 1984.** Clinical Implications of Developments in in Vitro Fertilisation. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 289 (6450): 978-80.
- Wu Gwo-Jang, Fung-Wei Chang, Shang-Sen Lee, Ya-Yuan Cheng, Chi-Huang Chen, et I-Ching Chen. 2009.** Apoptosis-Related Phenotype of Ejaculated Spermatozoa in Patients with Varicocèle. *Fertility and Sterility* 91 (3): 831-37.
- Yoon J, Llerette, Ana Maria Salicioni, Hoi Chang Lee, Myung-Sik Kim, John Parrington, et al. 2008.** Human Sperm Devoid of PLC, Ca(2+) Release and Are Unable to Initiate the First Step of Fertilisation. *The Journal of Clinical Investigation* 118 (11): 3671-81.



ANNEXES



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Annexes

Annexe. 1 : Fiche technique de PureSperm 100

PureSperm® 100

Application envisagée : résumé et explication

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

Composants

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

Caractéristiques

pH	7.4-7.8
Osmolalité (mOsm/kg H ₂ O)	300-310
Niveaux d'endotoxine	<1,0 EU/ml
Survie du sperme 18 heures après séparation par gradient de densité	>70 %

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

Les flacons et bouchons sont soumis à un test MEA sur 2 cellules.

Conservation et stabilité

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

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

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

Précautions et avertissements

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

Commandes

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



www.nidacon.com

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


Nidacon
International AB

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



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Recommandations

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

Réactifs et équipements

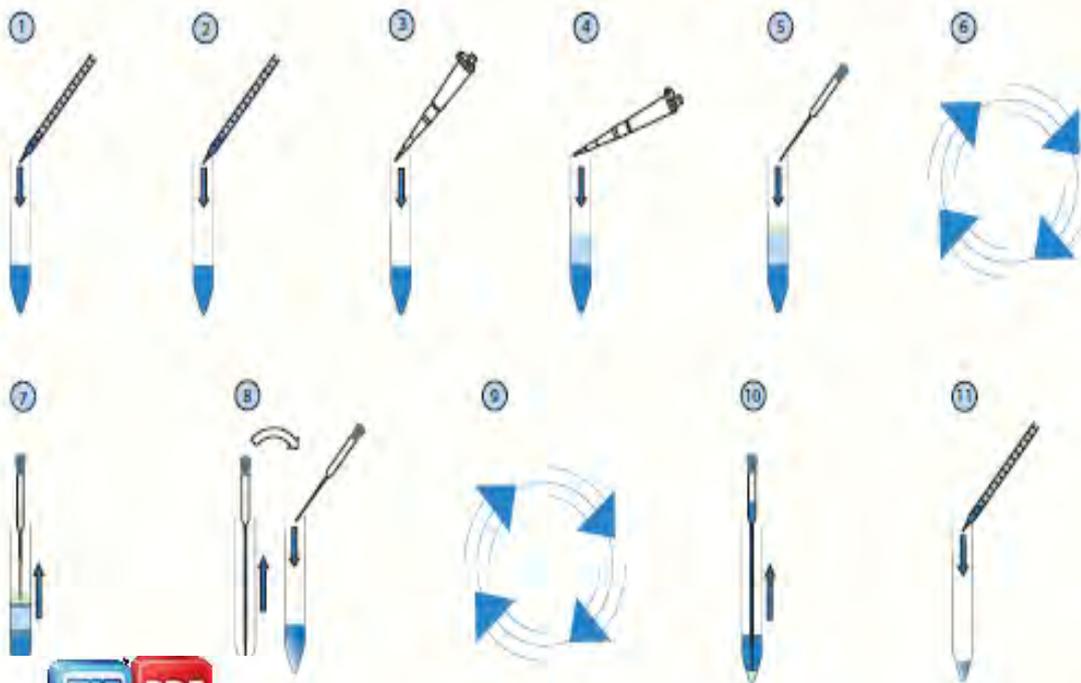
- PureSperm®100 , PureSperm® Buffer et PureSperm®Wash
- Centrifugeuse avec rotor basculant sur peilasse.
- Tubes à centrifuger coniques stériles et jetables (de type Falcon 2075).
- Pipettes stériles de 2 ml et 10 ml.
- Pipettes stériles Pasteur.

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

Amener toutes les solutions à température ambiante.

1. Ajouter 2 ml de PureSperm® Buffer à 8 ml de PureSperm®100 de façon à obtenir 10 ml de PureSperm® à 80 %
2. Ajouter 6 ml de PureSperm® Buffer à 4 ml de PureSperm®100 de façon à obtenir 10 ml de PureSperm® à 40 %
3. À l'aide d'une pipette à pointe stérile, ajouter 2 ml de PureSperm® à 80 % dans un tube à centrifuger conique

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



Annexe. 2 : Fiche technique de FertiCult™ Flushing medium

FertiCult™ Flushing medium

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

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

STERILE A

USED ABBREVIATIONS

ICSI Intracytoplasmic Sperm Injection
IUI Intra uterine insemination

GENERAL INFORMATION AND INTENDED USE

FertiCult Flushing medium is a formulation for washing of human ova, spermatozoa and embryos. FertiCult Flushing medium can also be used for swim-up techniques of human spermatozoa, sperm injection in oocytes during ICSI, introduction of washed spermatozoa in the uterus (IUI) and for embryo transfer. The medium is complete and needs no further additives. The medium contains HEPES; no CO₂ incubation is required. FertiCult Flushing medium does not contain heparin, thus for oocyte pick-up, use FertiCult Aspiration medium. As with all IVF media, FertiCult Flushing medium ought to be preincubated in the incubator for 12 hours before use (with lid closed).

COMPOSITION

FertiCult Flushing medium is a ready-to-use HEPES-buffered medium which also contains bicarbonate, physiologic salts, glucose, lactate and human serum albumin (4.00g/liter).

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

MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

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

MATERIAL NOT INCLUDED WITH THE KIT

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



IONS

≥ criteria)

ists after 96h): ≥ 80% after 30min of expo-

ducts if applicable
S are available upon request

Optimized using
trial version
www.balesio.com

PRE-USE CHECKS

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

STORAGE INSTRUCTIONS

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

WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

Always wear protective clothing when handling specimens.

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

METHOD

Washing of spermatozoa (suggested procedure)

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

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

Swim-up procedure (according to WHO, 2010)

1. Mix the semen sample (or semen/medium mix after performing "Washing of spermatozoa" procedure) well
2. Place 1ml of semen in a sterile 15-ml conical centrifuge tube, and gently layer 1.2ml of FertiCult Flushing medium over it. Alternatively, pipette the semen carefully under the medium.
3. Incline the tube at an angle of about 45°, to increase the surface area of the semen-culture medium interface, and incubate for 1 hour at 37°C.
4. Gently return the tube to the upright position and remove the uppermost 1ml of medium. This will contain highly motile sperm cells.
5. Dilute this with 1.5-2.0ml of FertiCult Flushing medium.
6. Centrifuge at 300-500g for 5 minutes and discard the supernatant.
7. Resuspend the sperm pellet in 0.5ml of FertiCult Flushing medium.

Embryo transfer (according to Brinsden, 2005)

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

BIBLIOGRAPHY

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



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

Annexe. 3 : Fiche technique de FertiCult™ IVF medium

FertiCult™ IVF medium

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

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



GENERAL INFORMATION

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

If preferred 10 % patient serum *v/v* can be added.

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

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

MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

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

MATERIAL NOT INCLUDED WITH THE KIT

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

PRODUCT SPECIFICATIONS

- Chemical composition
- pH: between 7.20 - 7.50 (37°C - 5 % CO₂)
- Osmolality: 270 - 290 mOsm/kg
- Sterility: sterile (SAL 10⁻³)
- Endotoxins: < 0.25 EU/ml
- Mouse Embryo Assay (blastocysts after 96h culture): ≥ 80% (48h exposure from zygote stage)
- Use of Ph Eur or USP grade raw materials if applicable
- Certificate of analysis and MSDS are available upon request

PRE-USE CHECKS

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

STORAGE AND CONSERVATION

- Store between 2-8°C

- Use the product longer than 7

W/

Ferrous albumin. Source materials is found negative when tested reactive for HbsAg, HBV RNA, known test method can offer human blood will not transmit

Optimized using trial version
www.balesio.com

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

Always wear protective clothing when handling specimens.

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

METHOD

PREPARATIONS FOR USE OF MICRO-DROPLETS

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

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

One oocyte is usually placed with about 10 000 sperm cells per micro-droplet, so if each patient during the next day is expecting 16 oocytes, at least two dishes per patient should be prepared. The dishes are then placed in the incubator (usually non-humidified) to equilibrate overnight at 37°C and under an atmosphere of 5% CO₂ in air.

Overnight equilibration is highly recommended.

PREPARATIONS FOR USE IN OPEN SYSTEMS

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

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

Up to five oocytes per dish (or well if using Nunc dishes) may be cultured together, usually with about 100 000 sperm cells per well.

So if each patient during the next day is expecting 15 oocytes at oocyte collection, at least six dishes per patient should be prepared (three for initial holding and cleaning of oocytes during collection and then three dishes for overnight culture).

When using Nunc dishes, two would be enough (since there are 4 wells per dish, the resulting 8 wells would be more than enough).

The dishes are then placed in the incubator to equilibrate overnight at 37°C and under an atmosphere of 5% CO₂ in air.

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

In the open system, paraffin oil is not necessary, but sometimes a 1ml layer of mineral oil may be added over the medium in the inner well.

When using such an open system the incubator must be humidified.

CULTURE

After equilibration overnight, the prepared dishes are ready for use.

During oocyte collection, oocytes are identified in the follicular aspirates and then washed before placing into the wells or droplets in the dish (as appropriate). Once oocyte collection is over, oocytes will be checked and may be rewashed, before then being placed into fresh droplets/wells for overnight culture.

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

The procedures described above are for the first 24 hours of culture. Once embryos have been identified by the presence of two pro-nuclei, they are usually placed into fresh dishes containing fresh medium.

In the past, where people have used cord serum or patient serum, the initial medium contains 10% and the changeover (after fertilisation has been confirmed) 15%.

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

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



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

Tel +32 (0)50 79 18 05 - Fax +32 (0)50 79 17 99

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

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

Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium

MEDIA FOR USE IN ART PROCEDURES

Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium is sterilised by sterile filtration

STERILE A

Document reference : FP09 I16 R01 B.2

Update: 21/10/2011

GENERAL INFORMATION

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

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

MATERIAL INCLUDED IN THE KIT

Product Code: HYA001

1mL Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium

Product Code: HYA010

10mL Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium

MATERIAL NOT INCLUDED IN THE KIT

Incubator (no CO₂)

Petri dishes

Glass pipettes

Microscope

FertiCult™ Mineral Oil

PRE-USE CHECKS

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

INSTRUCTIONS FOR USE

- 1 Warm hyaluronidase to a temperature of 37°C.
- 2 Prepare a dish containing 1 droplet of hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium (100 µL) and 3-5 droplets (100µL) of FertiCult™ Flushing medium for oocyte washing (all under mineral oil e.g. FertiCult™ Mineral Oil).
- 3 Place oocytes in the hyaluronidase (up to 5 oocytes maximum)
- 4 Use a pipette to transfer the partially denuded oocyte.
- 5 Rinse the oocyte with FertiCult™ Flushing medium.
- 6 Use a pipette to transfer the oocyte to the denudation medium.

Not to be used in a CO₂ incubator. Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium is EPES-buffered. Incubation time: 15-30 min at 37°C.

PRODUCT SPECIFICATIONS AND QUALITY CONTROL

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

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

STORAGE INSTRUCTIONS

- Store between 2-8°C
- Do not freeze before use
- Keep away from (sun)light
- After opening the container do not use the product longer than 7 days
- Do not use after expiry date

WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

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

Don't use media if cloudy.

BOVINE SOURCED HYALURONIDASE

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

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



Optimized using trial version
www.balesio.com

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

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

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

10% PVP in FertiCult Flushing Medium

VISCOUS MEDIUM FOR REDUCING SPERM MOTILITY

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

Document reference : FP09 I17 R01 B.3

Update: 08/04/08

GENERAL INFORMATION

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

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

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

For use in human assisted reproduction techniques.

MATERIAL INCLUDED IN THE KIT

Product Code : PVP001

1x 1mL 10% PVP in FertiCult Flushing medium

Product code: PVP0.2

5x 0.2mL 10 % PVP in FertiCult Flushing medium

MATERIAL NOT INCLUDED IN THE KIT

Incubator at 37°C (no CO₂)

Petri dishes

Glass pipettes

FertiCult Mineral Oil

FertiCult Flushing medium

PRODUCT SPECIFICATIONS AND QUALITY CONTROL

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

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

- U

Acei

10%

an in

NF 2

cons



products if applicable

Product is available on request.

The medium has been evaluated by passing the ISO10993-5/USP30-biocompatibility test. The product was

INST

Stan

Optimized using
trial version
www.balesio.com

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

Alternative procedure with extra washing step

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

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

STORAGE AND CONSERVATION

Store product upon arrival at 2-8°C.

Keep from light.

WARNING AND PRECAUTION

All human, organic material should be considered potentially infectious.

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

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

Don't use media if cloudy.

Bibliography

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

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

10% PVP in FertiCult Flushing medium is produced by:
FertiPro N.V., Industriepark Noord 32
8730 Beernem, Belgium.

URL: <http://www.fertipro.com>

E-mail: info@fertipro.com

Annexe. 6 : Fiche technique de FertiCult Mineral Oil

Mineral Oil



Optimized using
trial version
www.balesio.com

FertiCult Mineral Oil

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

FertiCult Mineral Oil is sterilized by filtration and aseptic filling

STERILE A

Document reference: FP09 I20 R01 A.9

Update: 29/10/2009

GENERAL INFORMATION

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

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

INTENDED USE

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

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

MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

Productcode: MINOIL50

1 x 50mL FertiCult Mineral Oil

Productcode: MINOIL100

1 x 100mL FertiCult Mineral Oil

Productcode: MINOIL500

1 x 500mL FertiCult Mineral Oil

MATERIAL NOT INCLUDED WITH THE KIT

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

PRODUCT SPECIFICATIONS AND QUALITY CONTROL

FertiCult Mineral Oil is manufactured according to these specifications:

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

- sterility: SAL 10⁻³
- mouse-embryo assay: ≥ 80% blastocysts after 96 hours in culture
- use of pharmaceutical grade mineral (parafin) oil

A certificate of analysis is available upon request.

PRE-USE CHECKS

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

INSTRUCTIONS FOR USE

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

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

STORAGE AND CONSERVATION

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

WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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



.....
) N.V.
 epark Noord 32
 eernem / Belgium
 e: www.fertipro.com
 E-mail: info@fertipro.com

Optimized using
 trial version
www.balesio.com

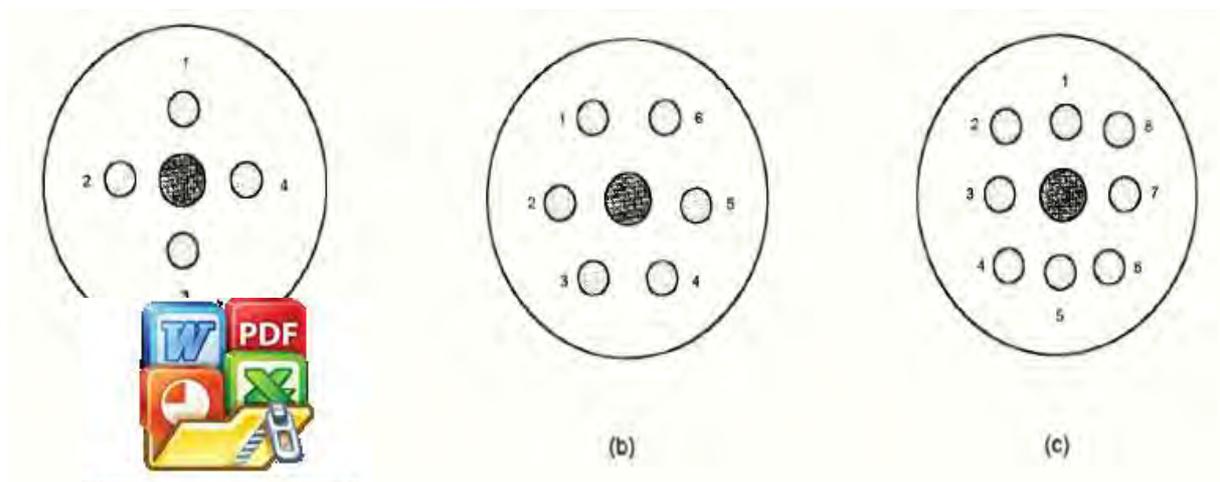
CE
 0344

Annexe. 7 : Chambre de Makler



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

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



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

RESUME

L'infertilité masculine est une pathologie relativement fréquente dans notre pays. Les facteurs étiologiques masculins sont multiples ce qui nous oriente vers une étude épidémiologique des différents facteurs de risque comportementaux et environnementaux diminuant les paramètres spermatiques. Le deuxième volet de cette étude a pour but de réaliser l'exploration moléculaire des formes très rares d'infertilité masculine liée à des tératozoospermies monomorphes (macrocéphalie et globozoospermie) en déterminant des mutations nouvellement décrites au niveau des gènes AURORA KINASE C et DPY19L2 respectivement et en déterminant pour la première fois la fréquence de ces anomalies rares au sein d'une population d'origine Algérienne.

Il s'agit d'une étude rétrospective descriptive portant sur les 404 patients orientés par leur médecin traitant pour diagnostic d'infertilité et destinés pour faire une PMA. Les paramètres épidémiologiques, cliniques et paracliniques ont été enregistrés pour chaque patient. 19 patients ayant des OAT avec des anomalies morphologiques sévères très rares (globozoospermie, macrocéphalie) ont été sélectionnés pour analyse génétique. Les 7 exons du gène AURKC ont été amplifiés à la recherche d'une mutation au niveau d'un de ces exons et la technique d'MLPA a été réalisée à la recherche d'une délétion du gène DPY19L2.

La fréquence des patients ayant un spermogramme et/ou un spermocytogramme pathologique était de 83,3% avec une prédominance de l'anomalie spermatique oligo-asthénotératospermie (OAT). Cette étude montre un effet modéré des facteurs de risque environnementaux et comportementaux sur les paramètres du sperme. L'exposition à la chaleur et aux toxines semble être le facteur le plus délétère pour la spermatogenèse. En revanche on observe une diminution significative dans la numération des sujets exposés à une forte chaleur et / ou des inhalations toxiques. Quatorze et sept hommes ont montré respectivement un profil typique de macrocéphalie et globozoospermie. Onze hommes avec macrocéphalie avaient une mutation homozygote AURKC (79%) ce qui indique que des mutations anormales ont été identifiées dans 2,7% des patients avec un spermogramme anormal. Cinq hommes analysés avec globozoospermie (n = 5) ont présenté une délétion homozygote DPY19L2. Cette étude a confirmé le caractère récurrent de la mutation AURKC et de la délétion DPY19L2 chez les hommes infertiles. On a observé que la macrocéphalie est 2-3 fois plus fréquente que la globozoospermie. Nos résultats confirment que l'ICSI ne peut pas être efficace pour les



Optimized using
trial version
www.balesio.com

patients atteints d'une mutation homozygote AURKC. Cela souligne l'importance du diagnostic moléculaire AURKC pour limiter les tentatives d'ICSI inutiles.

Mots clés : Infertilité masculine, infertilité primaire, infertilité secondaire, spermogramme, spermocytogramme, AURKC, macrocéphalie, DPY19L2.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

ملخص

العقم عند الرجال هو حالة شائعة نسبيا في بلدنا العوامل المسببة متعددة و هو ما يرشدنا إلى دراسة وبائية لمختلف المخاطر السلوكية والبيئية المسؤولة عن نقص في المعلمات المنوية. الجزء الثاني من هذه الدراسة يهدف الى الاستكشاف الجزيئي لأشكال نادرة من العقم عند الذكور المتعلقة ب *tératozoospermies monomorphes* لغرض تحديد طفرات مستكشفة حديثا في الجينات *AURORA KINASE C* و *DPY19L2* وتهدف هذه الدراسة لتحديد لأول مرة تردد هذه الحالات الشاذة غير عادية في عدد من السكان من أصل جزائري .

هذه دراسة وصفية بأثر رجعي من 404 مريضا لتشخيص العقم ، تم تسجيل المعلمات السريرية والمخبرية لكل مريض . وقد تم اختيار 19 مريضا مع OAT مع تشوهات مورفولوجية شديدة نادرة (*macrocéphalie* , *globozoospermie*) تم دراسة 7 الإكسونات من الجين *AURKC* للبحث عن طفرة في واحد من هذه الإكسونات وتقنية *MLPA* أجريت بحثا عن حذف الجين *DPY19L2* .

كان تردد المرضى الذين يعانون من مشكل في *spermogramme* أو *spermocytogramme* 83.3% مع غلبة في OAT وتبين هذه الدراسة تأثير معتدل للعوامل البيئية و السلوكية على معلمات الحيوانات المنوية. التعرض للحرارة و السموم يكون العامل الأكثر ضار لتكوين الحيوانات المنوية . كان هناك انخفاض ملحوظ في عدد المعرضين لارتفاع الحرارة و / أو استنشاق الجزيئات السامة . أربعة عشر رجلا وسبع على التوالي اثبتوا لمحة نموذجية ل *macrocéphalie* , *globozoospermie* . أحد عشر رجلا يعانون من *macrocéphalie* لديهم طفرة متماثلة *AURKC* (79 %) مما يشير إلى أن الطفرات *AURKC* تم تحديدها في 2.7% من المرضى الذين يعانون من *spermogramme* غير طبيعي. جميع الرجال الذين لديهم *globozoospermie* (ن=5) أظهرت لديهم طفرة متماثلة *DPY19L2* أو 1.2% من الرجال الذين يعانون من العقم. وأكدت هذه الدراسة انتشار الطفرتين لل *AURKC* وحذف *DPY19L2* عند الرجال المصابين بالعقم في الجزائر . لاحظنا أن *macrocéphalie* 2-3مرات أكثر شيوعا من *globozoospermie* نتائجا تؤكد أن الحقن المجهرى لا يمكن أن تكون فعالة للمرضى الذين يعانون من طفرة *AURKC* وهذا يسلط الضوء على أهمية التشخيص الجزيئي *AURKC* للحد من محاولات الحقن المجهرى التي لا لزوم لها.

الكلمات الرئيسية: العقم عند الرجال ، العقم الابتدائي، العقم الثانوي، *spermogramme* ، *spermocytogramme*،

AURKC ، *macrocéphalie* ، *DPY19L2*.



ABSTRACT

Male infertility is a relatively common condition in our country. Multiple male etiological factors are what guides us to an epidemiological study of the various factors behavioral and environmental risk decreasing sperm parameters. the second part of this study aims is to achieve the molecular exploration of rare forms of male infertility related to monomorphic tératozoospermia (macrozoospermia and globozoospermia), determining the newly described mutations in genes AURORA KINASE C and DPY19L2 respectively and determining for the first time the frequency of these unusual anomalies in a population of Algerian origin.

This is a retrospective descriptive study of 404 patients intended by their doctor for infertility diagnosis and intended for an AMP. Epidemiological, clinical and laboratory parameters were recorded for each patient. 19 patients with OAT with rare severe morphological abnormalities (globozoospermia, macrozoospermia) were selected for DNA analysis. 7 exons of the AURKC gene were amplified looking for a mutation in one of these exons and the MLPA technique was performed in search of a deletion of DPY19L2.

The frequency of patients with semen analysis and / or medical spermocytogramme was 83.3% with a predominance of sperm abnormality oligo-astheno-teratospermia (OAT). This study shows a moderate effect of environmental factors and behavioral risk on sperm parameters. The exposure to heat and toxins appear to be the most detrimental factor for spermatogenesis. There was a significant decrease in the count exposed to high heat and / or toxic inhalations. Fourteen men and seven respectively showed a typical profile of macrozoospermia and globozoospermia. Molecular diagnosis of AURKC and DPY19L2 was performed for these patients. Eleven men with macrozoospermia had a homozygous mutation AURKC (79%) indicating that mutations AURKC were identified in 2.7% of patients with abnormal semen analysis. All men with globozoospermia analyzed (n = 5) showed a homozygous deletion DPY19L2 or 1.2% of infertile men. This study confirmed the recurrence of two mutations AURKC and DPY19L2 deletion in Algerian infertile men.

We can not be effective for patients with AURKC homozygous oospermia is 2-3 times more common than globozoospermia. Our res can not be effective for patients with AURKC homozygous mu the importance of molecular diagnostics of AURKC gene to limit uni S.

Keywords: male infertility, primary infertility, secondary infertility, semen analysis, spermocytogram, AURKC, macrocephaly, DPY19L2.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

PUBLICATIONS



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Asian Journal of Andrology

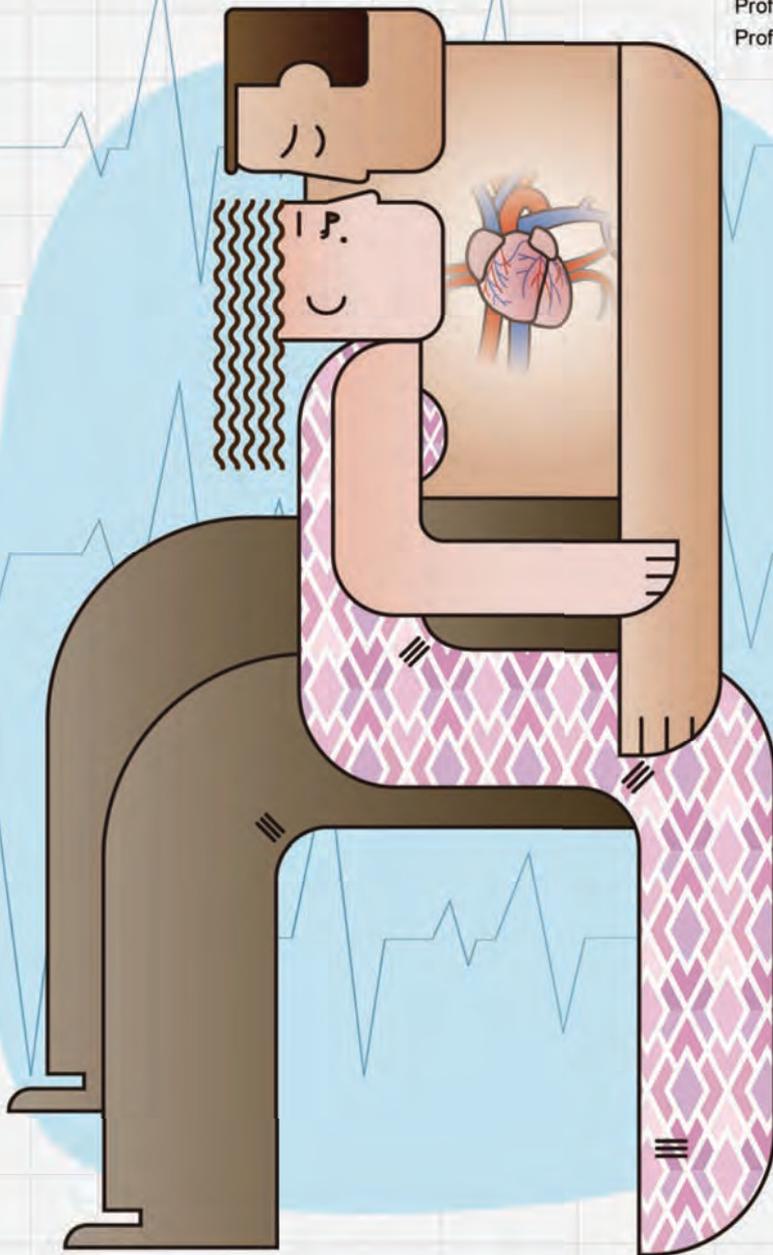
Volume 17, Issue 1, January 2015

亚洲男性学杂志
CN 31-1795/R
ISSN 1008-682X (Print)
ISSN 1745-7262 (Online)

SPECIAL ISSUE

Cardiovascular
disease
and male sexual
dysfunction

Guest Editors:
Prof. Martin Miner
Prof. Edward D Kim



www.asiaandro.com
www.ajandrology.com

Shanghai Institute of Materia Medica (SIMM)
Chinese Academy of Sciences
Asian Society of Andrology

Shanghai Jiao Tong University (SJTU)
SJTU School of Medicine



Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Male Fertility

Mutations of the aurora kinase C gene causing macrozoospermia are the most frequent genetic cause of male infertility in Algerian men

Leyla Ounis^{1,2}, Abdelali Zoghmar², Charles Coutton^{3,4,5}, Leila Rouabah¹, Maroua Hachemi¹, Delphine Martinez⁶, Guillaume Martinez^{3,4}, Ines Bellil¹, Douadi Khelifi¹, Christophe Arnoult^{3,4}, Julien Fauré^{3,6,7}, Sebti Benbouhedja², Abdelkader Rouabah¹, Pierre F Ray^{3,4,6}

Klinefelter syndrome and Y-chromosomal microdeletion analyses were once the only two genetic tests offered to infertile men. Analyses of aurora kinase C (*AURKC*) and *DPY19L2* are now recommended for patients presenting macrozoospermia and globozoospermia, respectively, two rare forms of teratozoospermia particularly frequent among North African men. We carried out genetic analyses on Algerian patients, to evaluate the prevalence of these syndromes in this population and to compare it with the expected frequency of Klinefelter syndrome and Y-microdeletions. We carried out a retrospective study on 599 consecutive patients consulting for couple infertility at the assisted reproduction unit of the Ibn Rochd Clinique, Constantine, Algeria. Abnormal sperm parameters were observed in 404 men. Fourteen and seven men had typical macrozoospermia and globozoospermia profiles, respectively. Molecular diagnosis was carried out for these patients, for the *AURKC* and *DPY19L2* genes. Eleven men with macrozoospermia had a homozygous *AURKC* mutation (79%), corresponding to 2.7% of all patients with abnormal spermograms. All the men with globozoospermia studied ($n = 5$), corresponding to 1.2% of all infertile men, presented a homozygous *DPY19L2* deletion. By comparison, we would expect 1.6% of the patients in this cohort to have Klinefelter syndrome and 0.23% to have Y-microdeletion. Our findings thus indicate that *AURKC* mutations are more frequent than Klinefelter syndrome and constitute the leading genetic cause of infertility in North African men. Furthermore, we estimate that *AURKC* and *DPY19L2* molecular defects are 10 and 5 times more frequent, respectively, than Y-microdeletions.

Asian Journal of Andrology (2015) 17, 68–73; doi: 10.4103/1008-682X.136441; published online: 22 August 2014

Keywords: aurora kinase C; *DPY19L2*; globozoospermia; intracytoplasmic sperm injection; infertility; macrozoospermia

INTRODUCTION

At least 70 million couples worldwide have infertility problems.¹ Male infertility has diverse, often multifactorial causes, resulting in quantitative and/or qualitative sperm defects in 61% of cases.² A large proportion of male infertility cases are caused by genetic defects, but few genes have been formally shown to be associated with spermatogenic defects since the discovery of microdeletions in the 1970s.³ Aurora kinase C (*AURKC*)⁴ and *DPY19L2*⁵ are the two principal genes implicated in macrozoospermia defects. They have been found to be more frequent in Algerian patients presenting macrozoospermia and globozoospermia, respectively. The conditions display typical sperm parameters and abnormal sperm morphological characteristics. Patients with macrozoospermia have mostly large-headed spermatozoa with a c.144delC deletion. The identification of rare

familial mutations⁷ and of a nonsense mutation, p.Y248*, in both European and North African men.⁸ An overall carriage frequency for these defects of 1/50 has been established for individuals from the general population of the Maghreb.⁶ We have shown that the large-headed spermatozoa of *AURKC*-deficient patients are tetraploid, indicating that meiosis cannot be completed without a functional *AURKC* protein.⁶ This confirms that men with homozygous *AURKC* mutations are unlikely to be able to father children. A positive genetic diagnosis thus provides a formal contraindication for *in vitro* fertilization by intracytoplasmic sperm injection (ICSI).⁶

Globozoospermia is another severe sperm defect leading both to primary infertility and to poor fertilization and embryo growth following ICSI. This phenotype is characterized by the production of small, round-headed spermatozoa with no acrosome. Mutations of *SPATA16*⁹ and *PICK1*¹⁰ have been identified in individuals with a family history of the globozoospermia, suggesting a role of these genes in the phenotype, although they cannot be the main cause of



Optimized using
trial version
www.balesio.com

¹Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Constantine I, Algérie; ²Clinique Ibn Rochd, Centre de Médecine de la Reproduction, Constantine, Algérie; ³Université Grenoble Alpes, Grenoble, France; ⁴Equipe Génétique Epigénétique et Thérapies de l'Infertilité, CNRS, AGIM, Grenoble, France; ⁵Laboratoire de Génétique Chromosomique, CHU Grenoble, Grenoble, France; ⁶Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, CHU Grenoble, Grenoble, France; ⁷Equipe Muscle et Pathologies, INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France.

Correspondence: Dr. PF Ray (pray@chu-grenoble.fr)

Received: 20 January 2014; Revised: 07 March 2014; Accepted: 14 May 2014

it. In a previous study, a recurrent homozygous deletion of *DPY19L2* was found in a large majority of globozoospermia patients, indicating that *DPY19L2* deletions were the main cause of the globozoospermia.⁵ These recurrent deletions were subsequently shown to have occurred by nonallelic homologous recombination (NAHR), due to the presence of repeated sequences on either side of the gene.¹¹ Point mutations were also identified in affected men,¹² further confirming the pathogenicity of *DPY19L2* mutation. We have shown that *DPY19L2* is a transmembrane protein required for the anchoring of the acrosome to the nucleus and that, in its absence, the acrosome is lost during the last stages of spermiogenesis.¹³ Unlike macrozoospermatozoa, globozoospermatozoa is not associated with any gross chromosomal abnormality, and *in vitro* fertilization by ICSI was expected to be an effective treatment strategy for these patients. However, fertilization, embryo cleavage and pregnancy rates following ICSI have consistently been disappointingly low for these patients.⁹

Macrozoospermia and globozoospermia are rare, recurrent forms of teratozoospermia more frequently found in subjects from North Africa than in men from elsewhere. The frequencies of these phenotypes and their etiologies have yet to be determined for the Algerian population. We report here the first genetic analysis of Algerian men with severe forms of teratozoospermia, focusing in particular on men with macro and globozoospermia.

MATERIALS AND METHODS

Semen analysis

Sperm was collected by masturbation after 3 days of abstinence. Spermograms were performed at the Ibn Rochd Clinique, Constantine, Algeria in accordance with World Health Organization guidelines,¹⁴ during the routine biological examination of the patients. David's classification was applied to spermocytograms.¹⁵

The variables recorded and analyzed in this study were ejaculate volume (ml), sperm concentration ($\times 10^6$ ml⁻¹), total sperm count ($\times 10^6$), percentage of progressive sperm cells (a + b), sperm

viability (%) and percentage of morphologically normal spermatozoa. We determined the percentage of morphologically abnormal spermatozoa (irregular, large-headed, multiple heads, round-headed) by analyzing 100 spermatozoa for each patient.

Sperm abnormalities were defined as followed: (1) asthenospermia (A): samples with a motility (a + b) <50%; (2) oligospermia (O): samples with a concentration <20 million spermatozoa ml⁻¹; (3) astheno-teratospermia (AT): samples with motility <50% and <30% spermatozoa with a normal morphology; (4) oligo-astheno-teratospermia (OAT): samples with a concentration <20 million spermatozoa ml⁻¹, a motility <50% and with <30% of spermatozoa displaying a normal morphology; (5) azoospermia (AZ): an absence of spermatozoa; (6) hypospermia or hyperspermia (H): sperm samples with a volume <2 ml and >6 ml, respectively.

Patient information

In total, 599 men consulting at the assisted reproduction unit of the Ibn Rochd Clinique, Constantine, Algeria, were included in this study between January 2011 and February 2012. All consulted for a period of infertility lasting at least 1 year. Y-microdeletion analysis was not carried out for all patients, so it was not possible to establish the frequency of this molecular defect for this cohort.

We identified 21 patients presenting with the most severe morphological abnormalities: fourteen patients with macrozoospermia and seven with globozoospermia. These patients had a normal somatic karyotype.

We analyzed the *AURKC* and *DPY19L2* genes for all patients with macrozoospermia and for five of the seven men with globozoospermia. The main clinical characteristics of the patients are shown in **Tables 1** and **2**. The testosterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone concentrations of the patients tested were in the normal range.

The study was approved by the Local Ethics Committee. Each patient was informed of the purpose of the study and signed a consent form. All national laws and regulations were respected.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes with a guanidium chloride extraction procedure, or from saliva with the Oragene DNA self-collection kit (DNA Genotech, Canada), according to the manufacturer's instructions.

Polymerase chain reaction and sequencing analyses

The seven *AURKC* exons and their intron boundaries were amplified as previously described.⁴ All analyses were carried out with BigDye Terminator version 3.1 sequencing kits and an ABI PRISM 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers and protocols used were as described elsewhere.⁴ Example of the results obtained is shown in **Figure 2**.

Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis

For this study, three synthetic multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) probes specific to exons 1, 17 and 22 of *DPY19L2* were used, as previously described.¹² Given the high level of sequence similarity between *DPY19L2* and other *DPY19L* paralogs and pseudogenes, MLPA probes were designed to match specific *DPY19L2* single-nucleotide mismatches at the ligation site.¹⁶ We also included three MLPA control probes specific to the *OCRL1* gene, as control probes for the determination of copy number. Information about the sequences and ligation sites of these control probes can be obtained from the study by Coutton *et al*.¹⁷ A comparison of the heights of the

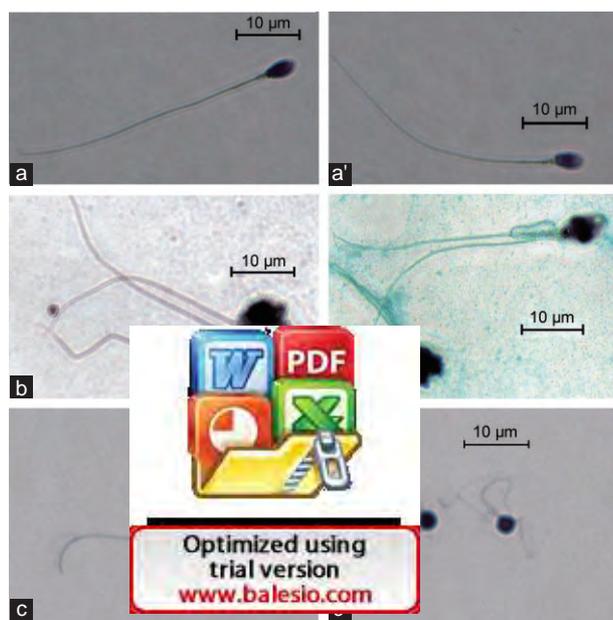


Figure 1: Photographs of representative spermatozoa from (a, a') a normal donor, (b, b') a patient with macrozoospermia (with a homozygous aurora kinase C c.144delC mutation) and (c, c') a patient with globozoospermia (with a homozygous *DPY19L2* deletion).

Table 1: Sperm characteristics and genotype of macrozoospermic men

	Family history	Count (10 ⁶ ml ⁻¹)	Motility (%)	Diagnosis	ICSI attempts	AURKC mutation
M1	The patient's parents had 4 spontaneous abortions	3.6	00	OAT 100% MS with MF	No	c. 114delC
M2	Yes	30.5	05	AT 100% MS	No	c. 114delC
M3	Yes	6	16	OAT 100% MS with MF	No	c. 114delC
M4	Yes	0.56	25	OAT 100% MS with MF	No	c. 114delC
M5	No	12	20	OAT 100% MS with MF	No	c. 114delC
M6	Yes	0.5	05	OAT 100% MS with MF	No	c. 114delC
M7	No	9	4.2	OAT With 95% MS with MF	One Results: negative	c. 114delC
M8	No	16	28	OAT With 70% MS	Two Results: 1/pregnancy 2/negative 3/spontaneous pregnancy	No mutation
M9	The patient's parents had 5 spontaneous abortions	0.5	6	OAT 100% MS with MF	No	p.Y248*
M10	No	4	12	OAT 100% MS with MF	One No microinjection	c. 114delC
M11	No	11	10	OAT 100% MS with MF	No	c. 114delC
M12	Yes	22.8	20	AT 75% MS with FM	One Results: no transferable embryos	No mutation
M13	No	0.1	00	OAT 70% MS	No	No mutation
M14	No	5×10 ⁶	1	OAT 95% MS with MF	One attempt Results: negative	c. 114delC

MS: macrocephalic spermatozoa, MF: multiflagellar; ICSI: intracytoplasmic sperm injection; OAT: oligo-astheno-teratospermia; AT: astheno-teratospermia; AURKC: aurora kinase C

Table 2: Sperm characteristics and genotype of globozoospermic men

	Family history	Count (10 ⁶ ml ⁻¹)	Motility (%)	Diagnosis	ICSI attempts	DPY19L2 mutation
G1	Yes	171	20	AT 100% globozoospermia	One Result: negative	Homozygous DPY19L2 Deletion
G2	Yes 2 infertile brothers	40	15	OAT 95% globozoospermia	Two Result: negative	Homozygous DPY19L2 Deletion
G3	Yes Brother of G4 and G5	16	30	OAT 100% globozoospermia	No	Homozygous DPY19L2 Deletion
G4	Yes Brother of G3 and G5	40	31	T 100% globozoospermia	No	Homozygous DPY19L2 Deletion
G5	Yes Brother of G3 and G4	56	25	OT 100% globozoospermia	No	Homozygous DPY19L2 Deletion
G6	No		40	OAT 90% globozoospermia	One Result: positive (twin birth)	No DNA available
G7	No		28	OAT 100% globozoospermia	Two Result: negative	No DNA available

ICSI: intracytoplasmic sperm injection; OT: oligo-teratospermia; AT: astheno-teratospermia



Optimized using trial version www.balesio.com

signals obtained about the number of copies of the sequence present in the sampled DNA

es provides information were as follows: (1) OAT (*n* = 104); (2) asthenospermia (*n* = 83); (3) AT (*n* = 79); (4) oligozoospermia (*n* = 76); (5) AZ (*n* = 46); (6) hypospermia or hyperspermia (*n* = 16). In total, 183 men presented teratospermia (AT + OAT), corresponding to 45% of the patients with abnormal spermograms or 31% of the men screened for couple infertility.

Fourteen patients presented macrozoospermia and seven presented globozoospermia.

RESULTS

Spermogram and spermocytogram

Abnormal spermograms were obtained from 404 (67%) of the 599 men undergoing examinations for infertility. The differential diagnoses



in the spindle assembly checkpoint (SAC): during meiosis, germ cells with misaligned chromosomes or abnormal microtubule tension that would result in incorrect segregation are blocked in prometaphase by the SAC. Men with heterozygous *AURKC* mutations may have a faster SAC, allowing meiosis to turn over more rapidly and to result in higher levels of sperm production. This would give these men a slight reproductive advantage, accounting for the high prevalence of the mutated alleles. However, the resulting gametes would be expected to display high rates of aneuploidy, probably resulting in high spontaneous abortion rates. Two of the patients in our cohort reported that their parents had suffered several spontaneous abortions. As a father and the mother are obligate carriers, they would have a high risk of aneuploidy gamete production, as described above.

DPY19L2 deletions were also frequent in our cohort. We have previously shown that these deletions occur by NAHR. New mutations are, therefore, relatively frequent, and we estimated the frequency of *de novo* deletion at about 1.5×10^{-5} per meiosis, regardless of the origin of the individuals.¹¹ The higher incidence of the globozoospermia observed in North African men is, therefore, probably not due to a higher allelic frequency (as observed for *AURKC*) but to the higher rate of consanguineous marriages specific to this population, strongly favoring the emergence of recessive traits.

Intracytoplasmic sperm injection treatment for macrozoospermic and globozoospermic men

Careful selection by motile sperm organelle morphology examination was used in a previous study to select the most normal-looking spermatozoa in patients with *AURKC* c.144delC deletions.¹⁹ Only six normal-looking spermatozoa were selected and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis was carried out on these spermatozoa. All six were aneuploid, confirming that ICSI should not be attempted for patients with *AURKC* mutations, even after very thorough morphological selection.¹⁹ In our study, ICSI was attempted for three patients with homozygous deletions. Injection was possible in two cases (M7 and M15), but no transferable embryos were obtained. The three patients with no *AURKC* mutation presented milder phenotypes, with <75% macrospermatozoa, whereas all the men with mutations had >95% macrospermatozoa). Two patients without *AURKC* mutations (M8 and M12) underwent ICSI. Injection was possible in each case, and the partner of one of these patients became pregnant. These results confirm the relevance of molecular diagnosis and the feasibility of ICSI for patients without *AURKC* mutations.

Intracytoplasmic sperm injection is also the only possible option for patients with globozoospermia. No gross chromosomal abnormalities of globozoospermatozoa are observed, but fertilization and pregnancy rates are very low.^{9,20,21} Recent studies have suggested that the low rate of fertilization is due to the absence of phospholipase C activity in globozoospermatozoa, resulting in the absence of calcium oscillations that are necessary for oocyte activation (AO). Artificial oocyte activation (AO) using calcium ionophore has been achieved, but the effects on the development of the embryo have not been evaluated. In our cohort: four unrelated men and three brothers, all with >90% round-headed spermatozoa. A genetic analysis was possible only for the three brothers and two other patients. All had a homozygous *DPY19L2* deletion. Several

attempts at ICSI were carried out. Fertilization was unsuccessful in all but one case. The exception, patient G6, was not genotyped, and a twin pregnancy resulted from the first attempt at ICSI. This patient had the lowest rate of the globozoospermia among the affected patients, suggesting that he may carry a milder *DPY19L2* point mutation or have a mutation of another gene.

GENERAL CONCLUSIONS

We identified 21 men with macrozoospermia or globozoospermia, accounting for 5.2% of the pathological spermograms analyzed (including azoospermic men). Our findings confirm the recurrent nature of the two *AURKC* mutations and of the *DPY19L2* deletion. Macrozoospermia was found to be 2–3 times more frequent than globozoospermia. Our results confirm that ICSI is not appropriate for patients with a homozygous *AURKC* mutation. As egg donation is not allowed in Algeria, adoption is the only remaining option for these patients. This highlights the importance of *AURKC* molecular diagnosis for limiting unnecessary ICSI attempts. The prognosis for men without mutations, generally with milder forms of this condition, is better. For these men, we recommend FISH sperm analysis to estimate sperm aneuploidy rate. For patients with globozoospermia, molecular diagnosis does not influence the choice of treatment, but is nevertheless important for the appropriate genetic counseling of couples with this rare form of male infertility. Some centers encourage the use of AOA regardless of the *DPY19L2* status. We advocate caution, as the potential long-term effects of AOA have yet to be determined. Our findings highlight the importance of screening for *AURKC* and *DPY19L2* mutations in North African men, as the frequency of mutations of these two genes appears to be higher than that of chromosome Y-microdeletions in this population.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LO, CC and DM carried out and interpreted all the molecular work. LO, AZ, LR, MH, GM, IB, DK, SB and AR supervised data acquisition and management. LO, CA, JF, AR and PFR carried out an analysis and interpreted the data. LO, LR and PFR designed the overall study, supervised all molecular laboratory work, wrote the main draft of the manuscript, had full access to all of the data and take responsibility for the integrity of the data and their accuracy. All the authors revised the manuscript and approved the final version.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded in part by GENOPAT 2009, from the French Research Agency (ANR) as part of the “Identification and Characterization of Genes Involved in Infertility (ICG2I)” project.

REFERENCES

- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007; 22: 1506–12.
- Schlosser J, Nakib I, Carré-Pigeon F, Staerman F. Male infertility: definition and pathophysiology. *Ann Urol (Paris)* 2007; 41: 127–33.
- Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34: 119–24.
- Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, *et al*. Homozygous mutation of *AURKC* yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* 2007; 39: 661–5.
- Harbuz R, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, *et al*. A recurrent deletion of *DPY19L2* causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet* 2011; 88: 351–61.



Optimized using trial version www.balesio.com

- 6 Dieterich K, Zouari R, Harbuz R, Vialard F, Martinez D, *et al*. The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 1301–9.
- 7 Ben Khelifa M, Zouari R, Harbuz R, Halouani L, Arnoult C, *et al*. A new AURKC mutation causing macrozoospermia: implications for human spermatogenesis and clinical diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2011; 17: 762–8.
- 8 Ben Khelifa M, Coutton C, Blum MG, Abada F, Harbuz R, *et al*. Identification of a new recurrent aurora kinase C mutation in both European and African men with macrozoospermia. *Hum Reprod* 2012; 27: 3337–46.
- 9 Dam AH, Koscinski I, Kremer JA, Moutou C, Jaeger AS, *et al*. Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 813–20.
- 10 Liu G, Shi QW, Lu GX. A newly discovered mutation in PICK1 in a human with globozoospermia. *Asian J Androl* 2010; 12: 556–60.
- 11 Coutton C, Abada F, Karaouzene T, Sanlaville D, Satre V, *et al*. Fine characterisation of a recombination hotspot at the DPY19L2 locus and resolution of the paradoxical excess of duplications over deletions in the general population. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003363.
- 12 Coutton C, Zouari R, Abada F, Ben Khelifa M, Merdassi G, *et al*. MLPA and sequence analysis of DPY19L2 reveals point mutations causing globozoospermia. *Hum Reprod* 2012; 27: 2549–58.
- 13 Pierre V, Martinez G, Coutton C, Delarochette J, Novella C, *et al*. DPY19L2 is required for anchoring the acrosome to the nucleus during spermiogenesis and its absence causes globozoospermia in mice. *Development* 2012; 139: 2955–65.
- 14 World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge, UK: Published on Behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press; 1999.
- 15 Auger J, Eustache F. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie* 2000; 10: 358–73.
- 16 Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, *et al*. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e57.
- 17 Coutton C, Monnier N, Rendu J, Lunardi J. Development of a multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for quantification of the OCRL1 gene. *Clin Biochem* 2010; 43: 609–14.
- 18 Tüttelmann F, Werny F, Cooper TG, Kliesch S, Simoni M, *et al*. Clinical experience with azoospermia: aetiology and chances for spermatozoa detection upon biopsy. *Int J Androl* 2011; 34: 291–8.
- 19 Chelli MH, Albert M, Ray PF, Guthauser B, Izard V, *et al*. Can intracytoplasmic morphologically selected sperm injection be used to select normal-sized sperm heads in infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome? *Fertil Steril* 2010; 93: 1347.e1–5.
- 20 Sahu B, Ozturk O, Serhal P. Successful pregnancy in globozoospermia with severe oligoasthenospermia after ICSI. *J Obstet Gynaecol* 2010; 30: 869–70.
- 21 Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Devroey P, *et al*. Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. *Hum Reprod* 1995; 10: 626–9.
- 22 Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, Lee HC, Yoo MS, *et al*. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca (2+) release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest* 2008; 118: 3671–81.
- 23 Heytens E, Parrington J, Coward K, Young C, Lambrecht S, *et al*. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod* 2009; 24: 2417–28.
- 24 Kuentz P, Vanden Meerschaut F, Elinati E, Nasr-Esfahani MH, Gurgan T, *et al*. Assisted oocyte activation overcomes fertilization failure in globozoospermic patients regardless of the DPY19L2 status. *Hum Reprod* 2013; 28: 1054–61.



Effect of Environmental and Behavioural Risk Factors on Sperm Parameters in Infertile Men of Eastern Algeria.



Science

KEYWORDS : male infertility; semen analysis; age; tobacco; profession.

Ounis L.	Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University 1 of Constantine, Algeria.
Zoghmar A.	Ibn Rochd Clinic, Centre for Reproductive Medicine, Constantine, Algeria.
Karaouzene T.	Laboratory AGIM, CNRS FRE3405, Equipe "Andrologie and Génétique", Tronche, University Joseph Fourier, Grenoble, F-38000, France.
Madhkour I.	Laboratory of epidemiology and preventive medicine, CHU of Constantine, Algeria.
Achili K.	Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University 1 of Constantine, Algeria.
Benbouhedja S.	Ibn Rochd Clinic, Centre for Reproductive Medicine, Constantine, Algeria.
Ray P.F.	Laboratory AGIM, CNRS FRE3405, Equipe "Andrologie and Génétique", Tronche, University Joseph Fourier, Grenoble, F-38000, France.
Rouabah L.	Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University 1 of Constantine, Algeria.

ABSTRACT

Objectives: The purpose of this study is to characterize environmental and behavioural risk factors that may be associated with altered sperm parameters.

Materials and methods: This is a retrospective study carried out in the centre of assisted reproduction clinic Ibn Rushd , Constantine. We selected 404 patients with pathological semen parameters and / or spermocytogramme. Epidemiological, clinical and laboratory parameters were recorded for each patient and, after exclusion of azoospermia cases, sperm parameters were studied for 327 patients.

Results: The semen was disrupted in 84.3% of cases with a predominance of oligo-astheno-teratospermia. We found a small effect of age, smoking and taking hot baths on sperm parameters. In contrast we observed a significant decrease in the sperm count of subjects exposed to high heat and / or toxic inhalations.

Conclusion: This study shows a moderate effect of environmental and behavioural risk factors on sperm parameters. Exposure to heat and toxic substances seems to be the most deleterious factor for spermatogenesis.

Introduction

Infertility is nowadays a real public health problem. It is defined by the absence of conception after 24 months of unprotected sexual intercourse (Brzakowski and al., 2009). It affects 80 million people worldwide and about one in six couples faces a primary or secondary infertility (Le Goff and al., 2008). Infertility affects 15% of couples in France (Sharlip and al., 2002), and in Algeria, the president of the national association of centres of assisted reproductive technology (ART) has estimated that 300 000 couples were infertile that is to say 7% of couples of reproductive age. This discrepancy can potentially be explained by the youth of the Algerian population and the average age of conception of the two thirds of couples attributed to women



Optimized using trial version www.balesio.com

The decrease in sperm production in men (Sharpe and Franks 2002). However, several studies published in the medical literature and revolving around these factors and infertility present conflicting results. Further studies are therefore needed in order to better understand the effect of these factors on sperm pathophysiology. The objective of this study is to characterize different environmental and behavioural risk factors that can be associated

with altered sperm parameters in a population of eastern Algeria. Materials and methods

Target population

This is a retrospective descriptive study of 599 consecutive cases received between January 2011 and February 2012 in the centre of medically assisted reproduction (PMA) at the Ibn Rochd private clinic, Constantine. In all cases the patients were referred to the clinic by their doctor for infertility diagnosis. Four hundred and four patients were included in this study according to the following criteria: 1) man: married for over a year, 2) semen and / or pathological spermocytogramme, 3) the use of in vitro fertilization (IVF) by Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) has been recommended. Men with normal semen analysis and spermocytogramme and intended for a PMA with a female indication were excluded. Spermatic parameters were studied for 327 patients after exclusion of azoospermia.

Through a questionnaire, each patient was interviewed on the following parameters : - Epidemiological : Age, occupation, place of habitat, lifestyle factors (physical activity, cigarette smoking and alcohol, hot baths, heat exposure, toxic agents and radiation). - Clinical: Type and duration of infertility, weight, urogenital history, medical, family, the couple inbreeding, parental consanguinity, data from the clinical examination. - Paraclinical: semen analyzes were performed according to the WHO criteria after a period of 3 to 4 days of abstinence, sperm collection is carried out in the laboratory, by masturbation. For normal sperm, the sperm count was ac-

cepted as greater than 20 million / ml; oligozoospermia 5-20 million / ml and severe oligozoospermia less than 5 million / ml. The mobility was assessed by calculating the proportion of normal motility forms and reduced motility (degree of a and b of the WHO classification) of the total number of mobile forms. The mobility has been described as normal if 50 % or more of sperms are progressively mobile less than 30 minutes after ejaculation, asthenozoospermia with less than 50 % of normal motility and decreased (a + b). The spermocytogram was performed according to the modified classification of David (Auger and al., 2000) to 327 patients. A normal sperm contains more than 30 % of normal sperm, teratozoospermia was noticed in over 70 % of abnormal sperm. A testicular biopsy was performed in some cases of azoospermia. An assessment of infection (Mycoplasma, Chlamydia, VDRL , TPHA , HIV1 , HIV2 , HCV, HBs Ag) was conducted systematically. Each patient underwent an ICSI involving the direct injection of a single spermatozoa into the cytoplasmic oocyte using a micromanipulator.

Statistical analysis:

Data collection was done on the basis of a questionnaire containing all the parameters to be studied before being introduced into an Access database. The results were analyzed by two statistical calculation software programs: 'EPIINFO v 3.5' and 'Med calcul'. These last two have allowed us to carry out for a descriptive analysis of each variable through the calculation of averages and frequencies and in order to check the independence of two or more qualitative characteristics, we used the PEARSON X2 statistical test. The search for a correlation between the parameters sperm and age was made by calculating the linear regression correlation coefficient, the ANOVA test was used to compare mean values between sperm parameters of the different groups studied (Table 1, 2 and 3).

Results

Frequency :

Of the 599 files included at the centre of the PMA for infertility, the frequency of patients with semen and / or pathological spermocytogramme was 83.3 %. We can therefore consider that among couples consulting for infertility, a feminine indication alone was present in 16.7 % of couples. Among the 404 patients included in our series, 70.5 % have shown a masculine indication alone and 29.5 % have shown a mixed masculine and feminine indication.

Clinically

Infertility was primary in 90.3 % (n = 365) and secondary in 9.7 % (n = 39) with an average duration of 6,7 + 3,6 years with extremes of one year and 20 years, with 42.8% of patients presenting infertility of 1-5 years , and 45% of 6-10 years.

Evolution of sperm

The average age of of 26 and 55 years provided the most followed by the 31 to ure.1). The average extremes of 18 and 26 to 40 years are fertility (p < 0.001) and frequently of second - 40 years) (p < 0.001).



Optimized using trial version www.balesio.com

age h extremes and 40 has .9 %) fol :0 %) (Fig- years with tients aged mary infer- suffer more atients (26

The distribution of age

frequencies shows that nearly 85% of our population of men are aged 25-45 years. The average ejaculat volume, calculated on the entire sample (327 cases), is 2.9+1.6 ml, the average sperm count was 37.6+35.6 (x106/ml), the average mobil-

ity of forms (a + b) is 28.8+17.4 %, the percentage of atypical forms is 67.9+22.6 %. The study of the linear regression of semen parameters according to age allows us to observe a significant correlation between age and sperm motility (P = 0.01) with a correlation coefficient r = 0.135, r2 = 0.015, indicating an increase in mobility with age. However analysis of our data by age bracket indicates a significant decrease in mobility and in the percentage of typical forms after 45 years (data not shown). The study by linear regression for all age groups indicates results that are apparently contradictory because of being based on the analysis of a large majority of patients in the 31-45 age bracket (Figure.1). The percentages of variance explained by the regression line (r2) and the correlation coefficients (r) demonstrated that there is no significant link (ns) between the spermatic volume, the sperm count and the frequency of atypical forms according to age (Figure.

2). Biologically

Regarding the spermatic results, the semen analysis was disrupted in 83.3 % of cases. Of these patients, oligo-asthenoteratospermia (OAT) was objectivised in 104 cases (25.7 %) and shows the sperm abnormality the most represented. We then observed an asthenospermia (A) in 83 patients (20.5 %), an astheno-teratospermia (AT) for 79 cases (19.5 %), azoospermia(AZ) was noted in 46 cases (11.4 %), an oligozoospermia (O) 41 cases (10.1 %) with a severe oligozoospermia (OS) 27 cases and a moderate oligozoospermia (OM) for 14 cases than an oligo-asthenospermia (OA) for 35 cases (8.4%) (Figure. 3). Finally, 16 cases (4 %) had abnormal volume (HPOR group) with 13 cases of hypospermia (HPO) and 3 cases of hyperspermia (HPR) , while for 100 patients (16.4%) the semen analysis was normal.

The occupation

Recruited patients were divided into seven socio-professional groups. The most represented group was the group 7 of officials with 27.7% (n = 108), followed by group 4 of military (63 cases) and security agents (17cas) with 21.03%, followed by the group of traders (70 cases) with 17.3%. The study of the dependence between the profession and sperm parameters showed a significant decrease in the sperm count p <0.01 of cooks, drivers and workers in comparison with the liberal profession group and a significant decrease in the count p <0.05 in the group of cooks, drivers, labourers and farmers sets in comparison with other groups (Table. 1).

Physical activity

217 subjects that is to say (53.7 %) do not practise any sport against 108 (26.7 %) of patients who practise sport regularly (≥ 2 times per week), 8.2 % practised it rarely and 11.4 % have stopped completely.

Hot baths

36.9 % of the studied patients regularly take hot baths against 63.1 % who rarely or never do. We found a significant difference in spermatic parameters p < 0.05 in both groups with an increase in the volume of patients who regularly take hot baths compared to those who don't take any (Table. 2).

Alcohol and tobacco

Regarding risk behaviors, among the cases studied, 210cas (52%) do not smoke against 175 cases (43.31%) who smoke. Of a total of 130 smokers, 90 patients or 69.2 % consume more than 20 cigarettes per day (c / d) against 40 patients (30.8 %) who consume less than 20 cigarettes per day. the link between cigarette smoking and sperm parameters did not show a significant difference in motility, morphology, and volume of the two groups but the difference in the count didn't show a decrease in the group who smoke (Table. 3). Among the 404 patients, 87.6 % of subjects never consumed alcohol

against 8.5 % who have consumed it. There is no significant difference between alcohol consumption and the various sperm parameters. Thirty-five alcoholic patients who smoke (AS) and 217 cases of non-alcoholic non-smokers (NA / NS). Primary infertility was objectivised in 91.4 % of cases of AS (32/ 35) and 91.7 % in NS / NA (199/217). The study of the influence of smoking and alcohol consumption together didn't show a significant difference in mobility, morphology and volume of sperm but the significant difference in count between the two groups of NS/NA and S/NA show a decrease in count in the group of NS/NA show a significant decrease in sperm parameters compared to other groups.

Urogenital history

Among the 404 patients, we identified in this study, 320 patients (79.2%) do not have urogenital history. Against by the rest of the population, 84 cases (20.8%) have urogenital history, we noted a predominance of varicocele with 64 cases (15.8%), followed by a history of testicular problems with 14 cases (3.5%) and the inguinal hernia with 6 cases (1.5%). Varicocele is associated with OAT in 19 cases or 29.7% of AT in 17 cases or 26.6% A and 10 cases or 15.6%.

Family history of infertility

Among the 404 cases, 281 cases or 69.6% having no family history, 123 cases (30.4%) were shown to have a family history of infertility. Among the 123 cases, we noted a high percentage of sibling history of infertility with 62 cases (15.3%) followed by family history with 43 cases (10.6%) and 18 cases with a history of siblings and family (4.5%).

Parental consanguinity

The concept of parental consanguinity is indicated in 59 cases (14.1 %) and not specified in 179 cases (44.3 %). The concept of parental consanguinity appeared in 33.9% of patients with a history of siblings, 33.3% of patients with a history of family and siblings together and 7% of patients with a history of family.

Discussion

At the completion of our work, we noted a frequency of semen analyzes and pathological spermocytogrammes 83.3%, our results are consistent with those in the literature with 81.5 % (Toure and al.,1995) and 91.9 % (Koikana Chacka 1998). Among the 404 patients included, 70.5 % represent masculine indications and 29.5 % represent male and female mixed indications. Furthermore, most studies agree that in recent decades there has been a remarkable decline in fertility rates in northern countries(Kaufmann and al., 1998),(Pearce and al., 1999) .Several studies have shown that masculine infertility, whether isolated or not, is present in over 50% of infertility in couples. We identified an African study which was conducted on 340 i which has found a male cause , 2003). In our study we obser our study we obser was about twice as high. This difference in the recruitment or sis.

Ninety percent of o lity, the average duration of i h extreme variability of 1 year 6-10 years is most frequent w majority of patients consult late literature that indicate an average of 6 years and extremes going from 1 to 30 years (Niang and al., 2009).

MacLeod in 1953 (Mac Leod and al., 1953) had found an increase in the conception period according to male age, regardless of the age of the woman. The study of the relationship between age and male fertility poses difficult methodological

problems. We cannot, in fact, evaluate the role of age on the male component of couples's fertility regardless of other factors of this fertility such as the age of the spouse, the evolution of the frequency of sexual intercourse. The study of the evolution of sperm characteristics with aging is one of the methods for analyzing indirectly the relationship between age and male fertility. In our series we noted an average age of 38+5.65 years, with extremes of 26 and 55 years and the age group of 36-40 years is the most represented with 37.90 % of patients (Figure. 1). Overall primary infertility rate is significantly higher among the age group 26-40 years ($p < 0.001$) compared to the age bracket of 41-55 years.

Logically secondary infertility was significantly higher among 41-55 years ($p < 0.05$) probably because some patients with sub-fertility have had more time to try in some cases taking new wives, sometimes more fertile, because polygamy is permitted in Algeria . Our results confirm those of the literature (Niang and al., 2009), (Bah and al., 2007). The advanced age of our patients may also be explained by the delay in the consultation because of the myth that the female bears the sole responsibility in the couple's infertility.

The study of the evolution of sperm characteristics in the 327 patients according to age

allows us to analyze the impact of age on sperm parameters. The percentages of variance explained by the regression line (r^2) and the correlation coefficients (r) demonstrated that there is no significant link (ns) between the spermatid volume, the sperm count and the frequency of atypical forms according to age. However, and surprisingly, an increase in mobility was observed with age ($p < 0.05$) (Figure. 2). An analysis by age bracket indicates that the mobility and the percentage of normal sperm decrease after 45 years. It was noted that these parameters can be correlated because in many cases the morphological abnormalities lead to impaired mobility. It was also observed that there is a slight decrease in sperm volume with age (Figure. 2).

Our results confirm those of the literature. Several studies have analyzed the influence of age on characteristics of semen in fertile men. Some studies (Boulegue and al., 1999) have reported that sperm parameters appear on average to be independent of the age between 20 and 60 years, which suggests that the quality of the ejaculate is retained until 50 to 60 years. (Schwartz and al., 1983)"container-title":"Fertility and sterility","page":"530-535","volume":"39","issue":"4","source":"NCBI PubMed","abstract":"The relationship between age and semen characteristics has been studied; any effect due to the influence of the length of abstinence preceding ejaculation was eliminated. There is an improvement in semen characteristics up to 25 years of age, followed by a leveling off and a subsequent decrease. This variation is not significant as far as the sperm count, semen volume, and the total number of spermatozoa are concerned. The variation, although small, is highly significant for the morphologic characteristics and pre-freeze and postthaw motility. The values for the older subjects were significantly lower for postthaw motility in the group 36 to 40 years of age, in the group 41 to 45 years of age for morphologic normality, and in the group 46 to 50 years of age for prefreeze motility. The lower values in the group 21 to 25 years of age are particularly noticeable with regard to morphologic characteristics. The same curve is encountered in the variation with age of each abnormal form, but the most marked variation is found in the increased percentage of coiled tails, which first appears in the group 36 to 40 years of age."ISSN":"0015-0282","note":"PMID: 6832409","journalAbbreviation":"Fertil. Steril.,"language":"eng","author":{"family":"Schwartz","given":"D"},{"family":"Mayaux","given":"M J"},{"family":"Spira","given":"A"},{"family":"Moscato","given":"M L"},{"family":



Optimized using trial version
www.balesio.com

y": "Jouannet", "given": "P"}, {"family": "Czyglik", "given": "F"}, {"family": "David", "given": "G"}], "issued": {"date-parts": [{"1983", 4}]}, "PM ID": "6832409"}], "schema": "https://github.com/citation-style-language/schema/raw/master/csl-citation.json"} compared the average values of five parameters: volume, sperm concentration, percentage of morphologically normal forms, percentage of mobile forms and total count in 833 fertile men aged 21-50 years. They did not reveal any significant changes in these parameters with age. On the other hand, they observed significant variations in the percentage of normal forms and the percentage of mobile forms with age: the latter reach a maximum between 25 and 35 years and then decrease in older men. These authors showed that the morphological abnormalities significantly observed are microcephalia forms before 25 years and coiled flagella after 45 years. It should be emphasized that through the recruitment of our population, there was a bias linked to the spread of the observed values of age, for a particular age, of all semen parameters, the small number of patients in some age brackets, may explain the absence of correlation between age and sperm parameters studied. Infections, environment, genetics, diseases and injuries are among the main causes of male infertility. Many professional situations are known to be a risk to the fertility of men who are exposed to them (Guerin, 2001), (Cohen, 1977). We noted a significant reduction $p < 0.05$ in counts and mobility in the groups exposed to toxic hazards and / or to high temperatures: drivers, cooks, farmers and workers in relation to other lower-risk groups (Table. 1). For the profession of driver, particularly exposed to environmental toxins, (Thonneau and al., 1991) showed a longer average conception period among those who had a time of driving of more than 3 hour / day. Some studies have demonstrated that in humans and animals, the heat disturbed the spermatogenesis and could reduce the male fertility (Maurice 1995). Men exposed to high temperatures is constitute therefore a population at risk and it was observed that the workers attending to ceramic kilns exhibited a drop in the mobility of gametes perhaps explaining a significant increase in couples without children in this population (Maurice 1995). This effect of the heat is not found in patients described as taking regular hot baths. Presumably, in this case, the frequency and duration exposure is not sufficient to alter gametogenesis.

In humans, certain pesticides such as dibromochloropropane or ethylene dibromide used by farmer cause alterations of spermatogenesis (Maurice 1995). It should be noted here that a decrease in sperm parameters was observed among farmers potentially exposed to many toxic substances. The association between cigarette smoking and infertility and altered sperm parameters has already been described. In the present study regarding risk behaviors, among the cases studied, 210 cases (52%) do not smoke against 175 cases (43.31%) who smoke. A total of 130 smokers: 20 c / d against 40 20 c / d. Recent studies showed that the blood-testis barrier is altered by cigarette smoke. The presence of smokers causes alterations in sperm parameters and sperm nuclear organization. Cigarette smoking is associated with pregnancy. The oxidative stress induced by tobacco seems to be one of the main causes of sperm quality, resulting mainly in the fragmentation of DNA (Cohen, 2002), and a change in the expression of the hormone prolactin (Kumosani and al., 2008). Numerous studies have implicated tobacco in erection disorders and alterations in sperm quality in particular; in 2008 the study of (Curtis and al., 1997) showed a significant decrease in the mobility as well as abnormalities in counting, whilst no significant differences were found as regards the volume and the quality of the sperm. In our study the link between cigarette smoking and sperm pa-

rameters did not show a significant difference in motility, morphology, and volume of the two groups but the difference in the count didn't show a decrease in the group who smoke (Table. 3). In our study we did not performed any test for measuring DNA fragmentation and cannot unfortunately confirm the effect of tobacco on this factor. We are currently collecting the ICSI results in order to assess whether the pregnancy rate is reduced in smokers, which may be due to a greater fragmentation of sperm DNA.

The data on the effect of alcohol consumption on spermatogenesis is rare; it shows an apparent protective effect of moderate drinking on sperm parameters probably due to the antioxidant effect of certain alcoholic beverages. Some studies have shown that alcohol consumption by men was not associated with fertility (Dunphy and al., 1991).

However, heavy drinking (> 20 units / week) is known to be associated with subfertility (Hassan and Killick 2004) United Kingdom. Our results are consistent with the literature and the correlation test between the different alcohol and sperm parameters did not show a significant difference. Note that only a minority of our patients admitted to drinking alcohol. Our predominantly Muslim population is probably not the most appropriate one to observe for a potential effect of alcohol, as this remains a taboo and all our patients did not report perhaps their alcohol consumption. The study of the influence of smoking and alcohol consumption together don't show a significant decrease in sperm parameters.

OAT and A are the two most representative abnormalities with 25.7 % respectively and 20.5 %, followed by AT and Azoospermia with 19.5 % and 11.4 % (Figure. 2) respectively. The presence of varicocele is also a common abnormality, the exact association between reduced male fertility and varicocele is not known but some WHO publications (Hamamah, Barthelemy 1997) clearly indicate that varicoceles are associated with sperm abnormalities, reduced testicular volume and deterioration of the function of Leyding cells. Numerous studies have shown a deleterious effect of varicocele on spermatogenesis in particular with a decrease in sperm density (oligospermia) or even azoospermia and reduced mobile forms (A), a teratozoospermia, or OAT. In our study we found a predominance of varicocele with 64 cases (15.8%) compared to other urogenital history. Varicocele is associated with OAT in 19 cases (18.3 %), AT in 17 cases (21.5 %) and A in 10 cases (12%). These results are consistent with a literature review which identified a small number of articles in which the data show the existence of an OAT in 25 to 65% of men carrying a clinical varicocele (Mieusset and al., 1996). A number of genetic abnormalities are responsible for infertility usually irreversible. This is particularly the case of Klinefelter syndrome. Other human infertilities of genetic origin accompanied by oligospermia or even azoospermia as is the case of agenesis of the deferent canals, which may however, be supported by ICSI. In some cases, ICSI should be accompanied by a genetic balance (constitutional karyotype, investigation of microdeletions of the Y chromosome). The presence of family history can guide us to a genetic cause. Among the 123 cases we noted a high percentage of sibling history of infertility with 62 cases (15.3 %), followed by family history with 43 cases (10.6 %) as well as 18 cases having a siblings and family history (4.5 %). Therefore the research at the time of the interrogation of family members suggestive of a genetic disorder should be part of the exploration of male infertility, although genetic counselling requires expertise in order to deliver adequate information about risks in siblings and family, offspring, the chances of success in cases of artificial procreation techniques.



Optimized using trial version www.balesio.com

Conclusion

This study shows a moderate effect of the environmental and behavioural risk factors on sperm parameters. Exposure to heat and toxins appear to be the most detrimental factor for spermatogenesis. We did not observe any adverse effects of alcohol and tobacco. In contrast we observe a significant decrease in the count of subjects exposed to high heat and / or toxic inhalations. This study confirms that certain environmental and behavioural factors can change sperm parameters and consequently lead to a drop in fertility. The couple's questioning, clinical examination and semen analysis are the essential elements of the balance sheet of male infertility. They direct additional tests that will identify one or more causes of infertility and thus tailor treatment specifically.

Tables

Table. 1: Comparison of mean values of sperm parameters of 7 professional groups

Professional groups	Effective	Count (10 ⁶ /ml)	Mobility (%)	Morphology (%)	Volume (ml)
Group1	33	27.5±29.8*	24.4±18.6	71.6±25.1	3.1±1.8
Group2	07	34.3±32.2	23.9±13	64.9±23.5	3.3±2.3
Group3	18	28.3±24.1**	28.8±18.3	61.9±26.9	2.8±1.5
Total Groups 1-3	58	28.5±28***	25.7±17.8	66.1±26.6	3±1.8
Group4	63	34.8±40	30±19.4	68.5±22.2	3.2±1.8
Group5	48	52.5±38.6*,**	31.4±18.6	65±22.9	2.9±1.9
Group6	60	41.6±38.6	27.7±16.4	66.2±22.2	2.8±1.6
Group7	88	39.9±41.9	29.6±16.1	71.2±20.6	2.8±1.4
Total Groups 4-7	259	41.4±40.5***	29.6±17.4	68.2±21.8	2.9±1.6
Big Total	317	38±35.7	28±17.2	67±23.3	3±1.8

Results are presented as mean ± SD. Significant differences between groups were noted: * p <0.01, **, *** p <0.05.

Group 1: cooks and drivers / Group 2: farmers / Group 3: workers / Group 4: security guards, military / Group 5: liberal / Groups 6: traders / Groups 7: officials.

Table. 2: Influence of hot baths on different sperm parameters

Groups	Effective	Count (10 ⁶ /ml)	Mobility (%)	Morphology (%)	Volume (ml)
Little hot baths	217	38			2.8±1.4*
Followers of hot baths	110	39			3.2±2*
Total	327	38.6±38.5	28.8±17.4	67.9±22.6	2.9±1.6

Results are presented as mean ± SD. Significant differences between groups were observed: * p <0.05

Table. 3: Influence of tobacco on different sperm parameters

Groups	Effective	Count (10 ⁶ /ml)	Mobility (%)	Morphology (%)	Volume (ml)
Group1	38	37.5±36.6	29.8±17.9	70.4±19.4	2.9±1.9
Group2	76	44.4±38.9*	28.6±16.9	67.9±21.7	2.7±1.6
Group 1+2	115	42.1±38.1**	29±17.1	68.7±20.9	2.8±1.7
Group3	167	32.7±31.9*,**	30±17.9	67±23.3	2.8±1.7
Total	182	36.5±34.8	29.6±17.6	67.7±22.4	2.9±1.6

Results are presented as mean ± SD, significant differences between groups were observed: *, ** p <0.05.

Group 1: Smoking <20c / d / group2: Smoking > 20c / d / Group 1+2 : smoker /Group 3: non-smokers

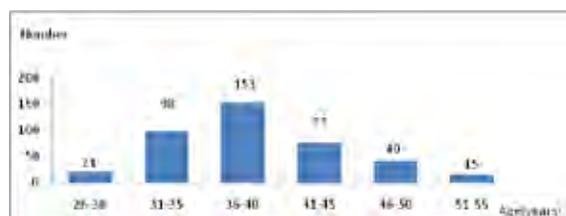


Figure. 1: Frequency distribution of age of the study population

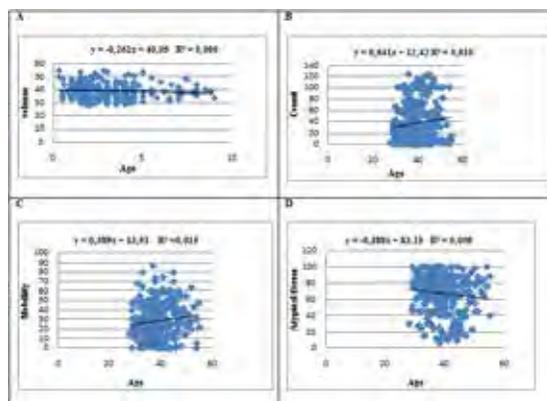


Figure. 2: Evolution of sperm parameters according to age A: Sperm volume, B: count, C: Mobility, D: Morphology sperm (% atypical forms).

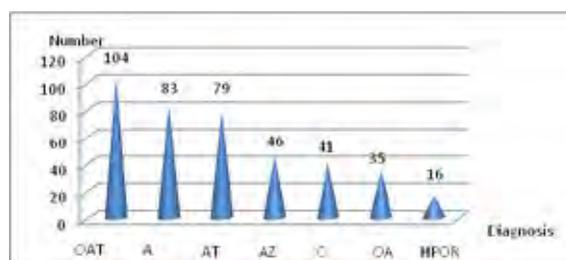


Figure. 3: Distribution of the frequency of sperm abnormalities.

A: asthénospermia / OAT: oligo-astheno-teratospermia / AT: astheno-teratospermia / O: oligospermia / OA: oligo-astheno-spermia / Az: azoospermia / HPOR: hypospermia + hyper-spermia.

REFERENCE

Macka Barry, et Mamadou Bobo Diallo. 2007. Infertilité masculine: Fréquence et aspects étiologiques au service d'Urologie-Andrologie du CHU de Conakry. *Andrologie* 17 (3): 241-245. | Boulegue, D., L. Janny, J. L. Pouly, D. Boucher, et J. Hermabessiere. 1999. Fertilité de l'homme en fonction de l'âge. *Andrologie* 9 (1): 28-41. | Brzakowski, M., E. Lourdel, R. Cabry, M.-F. Oliéric, C. Claeys, A. Devaux, H. Copin, et P. Merviel. 2009. Épidémiologie du couple infertile. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 38 (janvier): F3-F7. | Chabot, J. 1977. Les infertilités masculines. Paris, Masson. Vol. 13-15, 27-35, 45-46, 49, 51-60, 63, 66, 69-80, 123-124. | Dunphy, B C, C L Barratt, et I D Cooke. 2007. Infertilité masculine devant une infertilité féminine: une étude rétrospective dans une clinique de fertilité en Afrique du Sud. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 36 (1): 103-107. | Kumosani, T A, M F E. 2003. Infertilité masculine et féminine en Afrique du Sud. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 32 (1): 103-107. | Pearce D, Cant. 2003. Infertilité masculine et féminine: revue de la littérature. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 32 (1): 103-107. | M. Daudin, G. Massat, A. A. Ndiaye, et S. M. Guèye. 2003. Infertilité masculine et féminine: revue de la littérature. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 32 (1): 103-107. | Pearce D, Cant. 2003. Infertilité masculine et féminine: revue de la littérature. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 32 (1): 103-107. | Auger, J, F Eustache, et G. David. 2000. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie* 10 (4): 358-373. | Bah, Oumar Raphiou, Abdoulaye Bobo Diallo, Alimou Diallo, Sékou Guirassy, Ibrahima Bah, et al. 2007. Infertilité masculine: Fréquence et aspects étiologiques au service d'Urologie-Andrologie du CHU de Conakry. *Andrologie* 17 (3): 241-245. | Boulegue, D., L. Janny, J. L. Pouly, D. Boucher, et J. Hermabessiere. 1999. Fertilité de l'homme en fonction de l'âge. *Andrologie* 9 (1): 28-41. | Brzakowski, M., E. Lourdel, R. Cabry, M.-F. Oliéric, C. Claeys, A. Devaux, H. Copin, et P. Merviel. 2009. Épidémiologie du couple infertile. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 38 (janvier): F3-F7. | Chabot, J. 1977. Les infertilités masculines. Paris, Masson. Vol. 13-15, 27-35, 45-46, 49, 51-60, 63, 66, 69-80, 123-124. | Dunphy, B C, C L Barratt, et I D Cooke. 2007. Infertilité masculine devant une infertilité féminine: une étude rétrospective dans une clinique de fertilité en Afrique du Sud. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 36 (1): 103-107. | Kumosani, T A, M F E. 2003. Infertilité masculine et féminine en Afrique du Sud. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 32 (1): 103-107. | M. Daudin, G. Massat, A. A. Ndiaye, et S. M. Guèye. 2003. Infertilité masculine et féminine: revue de la littérature. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 32 (1): 103-107. | Pearce D, Cant. 2003. Infertilité masculine et féminine: revue de la littérature. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 32 (1): 103-107. | Le Goff, S., N. Lédée, et G. Bader. 2008. Obésité et reproduction : revue de la littérature. *Gynécologie* 3. The male factor in fertility and infertility. VII: Semen quality in relation to age and sexual activity. *fertility* 95. Environnement, spermatozoïdes et descendance. *Medecine/science* 11: 571-7. | Mieusset, R., L. Bujan, et al. 2002. Best Practice Policies for Male Infertility. *Fertility and Sterility* 77 (5): 873-882. | Sharpe, Richard M, et Stephen Franks. 2002. Environment, Lifestyle and Infertility--an Inter-Generational Issue. *Nature Cell Biology* 4 Suppl (octobre): s33-40. | Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. 1991. Incidence and main cause of infertility in a resident population (1850000) of three French regions (1988-1989). In , 811-6-6. | Toure A, Traore M, Zubowa I. 1995. Aspects cytopermiologiques de la stérilité masculine. *Revue Malienne de Sciences et Technologie*. 2:5. | Trummer, Harald, Helga Habermann, Josef Haas, et Karl Pummer. 2002. The Impact of Cigarette Smoking on Human Semen Parameters and Hormones. *Human Reproduction (Oxford, England)* 17 (6): 1554-1559. |



Optimized using trial version www.balesio.com

**Université Constantine 1-Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire**

Nom : **OUNIS**
Prénom : **LEYLA**

Date de soutenance :

**Titre : Les anomalies morphologiques responsables des infertilités masculines dans l'Est Algérien :
Aspect épidémiologique et génétique**

Résumé

L'infertilité masculine est une pathologie relativement fréquente dans notre pays. Les facteurs étiologiques masculins sont multiples ce qui nous oriente vers une étude épidémiologique des différents facteurs de risque comportementaux et environnementaux diminuant les paramètres spermatiques. Le deuxième volet de cette étude a pour but de réaliser l'exploration moléculaire des formes très rares d'infertilité masculine liée à des tératozoospermies monomorphes (macrocéphalie et globozoospermie) en déterminant des mutations nouvellement décrites au niveau des gènes AURORA KINASE C et DPY19L2 respectivement et en déterminant pour la première fois la fréquence de ces anomalies rares au sein d'une population d'origine Algérienne.

Il s'agit d'une étude rétrospective descriptive portant sur les 404 patients orientés par leur médecin traitant pour diagnostic d'infertilité et destinés pour faire une PMA. Les paramètres épidémiologiques, cliniques et paracliniques ont été enregistrés pour chaque patient. 19 patients ayant des OAT avec des anomalies morphologiques sévères très rares (globozoospermie, macrocéphalie) ont été sélectionnés pour analyse génétique. Les 7 exons du gène AURKC ont été amplifiés à la recherche d'une mutation au niveau d'un de ces exons et la technique d'MLPA a été réalisée à la recherche d'une délétion du gène DPY19L2.

La fréquence des patients ayant un spermogramme et/ou un spermocytogramme pathologique était de 83,3% avec une prédominance de l'anomalie spermatique oligo-asthéo-tératospermie (OAT). Cette étude montre un effet modéré des facteurs de risque environnementaux et comportementaux sur les paramètres du sperme. L'exposition à la chaleur et aux toxines semble être le facteur le plus délétère pour la spermatogenèse. En revanche on observe une diminution significative dans la numération des sujets exposés à une forte chaleur et / ou des inhalations toxiques. Quatorze et sept hommes ont montré respectivement un profil typique de macrocéphalie et globozoospermie. Onze hommes avec macrocéphalie avaient une mutation homozygote AURKC (79%) ce qui indique que des mutations d'AURKC ont été identifiées dans 2,7% des patients avec un spermogramme anormal. Tous les hommes analysés avec globozoospermie (n = 5) ont présenté une délétion homozygote DPY19L2, ou 1,2% des hommes. Ces résultats ont confirmé le caractère récurrent des deux mutations AURKC et de la délétion DPY19L2 chez les hommes infertiles de l'Algérie. Nous avons observé que la macrocéphalie est 2-3 fois plus fréquente que la globozoospermie. Nos résultats confirment que l'ICSI ne peut pas être efficace chez les hommes atteints d'une mutation homozygote AURKC. Cela souligne l'importance du diagnostic génétique pour limiter les tentatives d'ICSI inutiles.

Mots clés : infertilité primaire, infertilité secondaire, spermogramme, spermocytogramme, AURKC, macrocéphalie, DPY19L2.

Laboratoires de recherche : Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Constantine 1.
Biochimie et Génétique Moléculaire, DBTP, CHU, Grenoble, France.