

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

République du Mali
Un Peuple-Un But-Une Foi

Université des Sciences, des Techniques et des Technologies
de Bamako (USTTB)



Faculté de Pharmacie



Année Universitaire :2022-2023

N°

THÈSE

**Étude de la Fragmentation de l'ADN Spermatique
par la Technique de Dispersion de la Chromatine des
Spermatozoïdes Chez les Hommes Consultant pour
une Infertilité au Mali**

Présentée et soutenue publiquement le/...../2023 devant la
Faculté de Pharmacie par

M^{lle} BINTOU COULIBALY

**Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'État)**

JURY

Président: Pr. Mahamadou TRAORE

Membre: Pr. Guida Landouré

Membre: Pr. Mamadou Sima

Membre : Pr. Sékou Bah

Co-directrice: Pr. Djénèba Dabitaou

Directeur: Pr. Oumar Samassekou

DEDICACES ET REMERCIEMENTS

DEDICACES

Je dédie ce travail à :

La mémoire de mon merveilleux père **Issa Coulibaly** décédé en 2014 et qui de là où il est, continu de veiller sur moi. Merci d'avoir pris soin de moi tout au long de ma vie, de m'avoir encouragé, soutenu et protégé. Je suis très fière d'être ta fille et de pouvoir enfin réaliser ce que tu as tant espéré et attendu de moi. Ce travail est le fruit de tout tes sacrifices pour mon éducation et ma formation. Puisse Allah t'accorder le paradis. Amen

À ma mère **Mariam Doumbia**

Ma petite maman que j'aime de tout mon cœur, aucun mot n'est assez fort pour te remercier de m'avoir donné la vie. Une vie que tu as su remplir d'amour, de joie et de tendresse. Tes prières et tes bénédictions m'ont été d'un grand secours pour terminer mes études, merci d'être toujours à mes côtés. Tu es simplement la femme de ma vie. Puisse le tout puissant te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur. Je t'aime.

À ma mamie adorée **Doussou Doumbia** ma vie et mon bonheur que Dieu te protège et te garde longtemps auprès de nous.

À la mémoire de mon grand-père **Abdourahmane Doumbia** que Dieu le garde dans son vaste paradis

À mon fils **Mohamed Yahya Arby**

Mon petit sang, tu es mon bonheur et ma plus grande chance au monde. Merci de m'avoir redonné le sourire et l'envie de vivre, merci pour toutes ces larmes de joie versées pour toi. Je te souhaite toutes les bénédictions du monde, une mer d'amour, beaucoup de bonheur. Je t'aime de tout mon cœur.

À mon incroyable oncle et mentor **Dr. Ousmane Coulibaly (OCB)**

Tu es un père et une source d'inspiration pour moi. Merci d'avoir accepté de me soutenir et de m'accompagner dans cette aventure. Merci d'avoir eu un impact positif sur mon parcours. Je tiens à t'exprimer ma gratitude pour tes encouragements constants.

À mon oncle **Moussa Konate**

Mon précieux oncle, nous sommes chanceuses de t'avoir. Tu nous as toujours guidées sur le bon chemin. Merci de toujours nous soutenir, merci pour tout.

À mes frères et sœurs : **Soungalo Coulibaly, Sira Coulibaly, Aminata Coulibaly, Mariama Coulibaly, Habiba Coulibaly, Kadiatou Coulibaly, Moussa Coulibaly, Fatoumata Coulibaly,**

Être frères et sœurs signifie être là les uns pour les autres, vous m'avez tous toujours soutenus, réconfortés et encouragés. Pour tout l'amour que vous me réservez je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.

À toute ma famille

Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez. Que Dieu vous garde et vous accorde santé et bonheur.

REMERCIEMENTS

Merci **ALLAH** de m'aider à réaliser ce grand objectif de ma vie, merci pour tous tes bienfaits dans ma vie, tu as été là pour moi chaque instant ; tu as écouté mon angoisse et tu m'as rempli de courage, de force et de patience pour finir avec succès.

Au Docteur Abdourahamane Haidara

Je tiens à vous exprimer ma plus profonde gratitude pour m'avoir formé pendant ma période d'apprentissage à l'INSP. Vous m'avez accueilli avec beaucoup de gentillesse au sein de votre équipe, c'est grâce à vous que j'ai pu allier théorie et pratique. Ce fut un honneur pour moi de bénéficier de votre soutien et de votre dynamisme tout au long de ce travail.

Je remercie également **Dr Cheick O Sidibé, Mr Salia Bamba, Dr Modibo Goita, Dr Ousmane Doumbia, Dr Christine Ongoiba** qui m'ont apporté leur aide lors de l'élaboration de cette thèse. Je vous exprime toute ma reconnaissance pour votre disponibilité et votre efficacité.

Un grand merci à toute la famille **Coulibaly** particulièrement à **Dr Ousmane Coulibaly, Dr Aminata Coulibaly, Lalla Sadessy** pour leurs accueils chaleureux, leurs amours, leurs conseils ainsi que leurs soutiens inconditionnel, à la fois moraux et financiers, qui m'ont permis de réaliser mes études par conséquent cette thèse. Soyez assuré de ma reconnaissance la plus sincère.

À mes ami(e)s : **Ramata Bengaly, Bintou Moustapha, Dr Rokiatou Diallo, Dr Bintou Kanouté, Dr Mariam Diawara, Dr Aissata Sangare, Coumba N'daou, Salihou Saidou, Khadidja Abdallah, Pevetmi Abdel Malick, Mahamadou Traoré (Matrao), Dr Aboubacar Cissouma, Dr Ousmane Doumbia, Djiguiba Toure, Dr Abdel Kader Cissé, Fatoumata Nientao, Dr Fatoumata Ina Traoré, Awa Diallo, Dr Fatoumata Tininko Diallo, Dr Fanta Kouyaté, Sherif Haidara,**

Dr Gbessemehlan Jeanine Damienne, Dr Kanté LH, Bana Konaré, Fatima Sidibé , Demba Dembélé, Demba Dicko, Wandji Grace chanel.

Les amis sont comme des membres de la famille que nous choisissons par nous-même, j'ai eu de la chance de rencontrer des personnes comme vous. Je vous suis reconnaissante pour la sincérité de notre amitié et pour l'influence positive que vous apportez dans ma vie.

À notre équipe de recherche: **Pr Mahamadou Traoré, Pr Guida Landouré, Pr Oumar Samassekou, Dr Mamadou Keita, Pr Guinto Cheick Oumar, Dr Cisse Abdel Kader, Dr. Yalcouye Abdoulaye, Dr. Bocoum Abdoulaye, Dr. Dembele Mohamed Emile, Dr. Fousseyni Kané , Dr. Alassane Baneye Maiga, Dr. Oumou Traore, Dr Cheick O Sidibe, Salia Bamba, Dr Amoro Traore, Demba Samake, Dr Christine Ongoiba, Dr Ousmane Doumbia, Dr Modibo K Goita, Dr Moussa Aly Sangare, Dr Aïssata Toure, Dr Mahamadou Kotioumbe, Kadidiatou Diallo, Issouf Ballo.**

À la famille **Maguiraga**

Je vous remercie pour votre sympathie et pour l'attention que vous m'avez portée durant mon séjour en Afrique du Sud.

Je remercie également **Mahamadou Sadikou Gassama**, tu as été aux petits soins avec moi. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ta compassion et ta patience.

Je remercie **Dr Etienne Algiman**, Directeur du laboratoire ALGI pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire

Je remercie également tout le personnel du laboratoire ALGI particulièrement **Sitan Keita** et **Tidiane Tall** merci pour la bonne humeur que vous faites régner dans le laboratoire. Je vous remercie également pour toute l'aide que vous m'avez apporté lors de ces années de travail.

À tout le personnel de l'unité de cytogénétique et de biologie de la reproduction de l'Institut National de Santé Publique INSP trouvez ici l'expression de mon profond respect.

Je tiens à remercier tous les membres de l'Amicale des Étudiants en Pharmacie (AEP) pour leur sympathie, j'ai passé de bons moments en votre compagnie.

À tout le personnel de la **pharmacie Bougie BA** ainsi que celui de la **pharmacie BADIALLO** trouvez ici l'expression de ma reconnaissance pour tous vos différents soutiens.

À tous mes camarades de la **promotion 12 du Numerus Clausus** merci pour tous ces beaux moments partagés.

Je tiens à adresser mes remerciements aux patients qui ont été intégrés dans cette étude sans qui cette thèse n'aurait pas pu avoir lieu.

En fin de compte, un immense merci à tous ceux et celles qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce modeste travail.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maitre et Président du jury

Professeur Mahamadou TRAORE

- **Professeur Honoraire de génétique à la Faculté de Pharmacie de l'USTTB**
- **Co-investigateur de l'étude sur les pathologies neurologiques héréditaires au Mali**
- **Président et membre fondateur de la Société Malienne de Génétique Humaine**
- **Membre du Consortium Human Heredity and Health in Africa (H3Africa)**
- **Membre de la Société Africaine de Génétique Humaine**
- **Membre de la Société Malienne de Neurosciences**
- **Co-investigateur de l'étude sur la génétique de l'épilepsie au Mali**

Cher Maitre,

C'est un grand plaisir et un honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos différentes occupations. Nous avons été profondément émerveillés par votre gentillesse, votre humilité, votre simplicité et votre disponibilité permanente. Je vous remercie grandement de m'avoir accompagnée et de m'avoir appris à être plus autonome tout au long de ce travail de recherche. Je suis ravie d'avoir travaillé en votre compagnie car outre votre appui scientifique, vos enseignements et votre aide vous m'avez soutenu et conseillé.

Votre expérience et votre appétence pour le domaine ont fortement contribué à la réussite de cette thèse. Soyez assuré de ma très haute considération.

A notre Maitre et juge

Professeur Guida Landouré

- **Spécialiste en Neuro génétique (MD, PhD)**
- **Praticien hospitalier au CHU du Point G**
- **Maitre de conférences à la FMOS**
- **Investigateur principal de l'étude sur les pathologies héréditaires au Mali**
- **Secrétaire général de la Société Malienne de Génétique Humaine**
- **Membre de la Société Malienne de Neurosciences**
- **Membre de la Société Africaine de Génétique Humaine**
- **Membre de la Société Américaine de Génétique Humaine**
- **Membre du consortium Human Heredity and Health in Africa (H3Africa)**
- **Membre du Réseau International des Maladies Rares**

Cher maitre,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples engagements. Nous avons bénéficié de votre expertise et de vos conseils éclairés. Vos suggestions ont été très pertinentes pour l'amélioration de ce travail.

Votre abord facile, votre disponibilité, votre humanisme et votre modestie forcent respect et admiration.

Je vous prie d'agréer mes respectueux hommages.

A notre Maître et juge

Professeur Mamadou SIMA

- **Gynécologue obstétricien**
- **Maitre de conférences à la FMOS**
- **Chargé de cours à la FMOS**
- **Praticien hospitalier au CHU du Point G**
- **Chargé de cours à l'institut national de formation en science de la santé (INFSS)**

Cher Maître,

Je tiens tout d'abord à vous remercier pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail en acceptant de faire partie de ce jury. Nul doute que vous êtes un excellent clinicien. Votre maîtrise de la gynécologie et votre intérêt pour la recherche sont incontestables. Merci d'offrir vos connaissances à notre étude. Veuillez croire à l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon respect.

A notre maitre et juge

Pr Sékou Bah

- **Vice doyen de la faculté de Pharmacie**
- **Maitre de conférences en pharmacologie à la FMOS/FAPH**
- **Membre du comité technique de pharmacovigilance**
- **Chef de service de la pharmacie hospitalière du CHU point G**

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré occupations professionnelles. Votre amabilité et vos qualités humaines nous ont fortement marqués.

Veillez agréer l'expression de mon estime et de mon plus grand respect.

A notre Maitre

Professeur Djénéba Koumba Dabita

- **Spécialiste en Biologie Moléculaire et en Immunologie**
- **Maitre de conférences à la faculté de Pharmacie**
- **Cheffe du Laboratoire ImmunoCore du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) de l'USTTB.**

Chère maitre,

C'est un très grand privilège que de vous compter dans notre jury de thèse. Vos qualités scientifiques indiscutables et votre simplicité forcent admiration. Les femmes étant sous représentées dans le domaine de la science vous êtes un modèle pour nous toutes. Je vous remercie aussi d'avoir accepté de co-diriger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements et de notre profond respect.

A notre Maitre et directeur de Thèse

Professeur Oumar SAMASSEKOU

- **Spécialiste en génétique médicale et pathologie moléculaire**
- **Maitre de Conférence en génétique et génomique à la FMOS de l'USTTB**
- **Membre fondateur de la Société Malienne de Génétique Humaine**
- **Membre de la Société Africaine de Génétique Humaine**
- **Membre du Consortium Human Heredity and Health in Africa (H3Africa)**

Cher maitre,

Je vous remercie infiniment d'avoir accepté d'encadrer ce travail avec rigueur scientifique. Je suis très reconnaissante pour la confiance que vous avez eue en moi et pour le temps que vous avez consacré à l'élaboration de ce travail malgré vos multiples occupations. Cette thèse doit beaucoup à vos observations avisées et vos précieux conseils. Votre écoute attentive m'a permis de retrouver la patience perdue dans les moments difficiles. Votre immense savoir pluridisciplinaire, votre gentillesse, votre humilité et votre humour impose respect et admiration. J'espère que mon travail aura été à la hauteur de vos attentes.

Recevez le témoignage de ma profonde reconnaissance.

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	2
2. OBJECTIFS	5
2.1 Objectif général	4
2.2 Objectifs spécifiques	4
3. GENERALITES	6
3.1. Rappel anatomique du système reproducteur male	6
3.2. Spermatogenèse	8
3.3. Contrôle hormonal de la spermatogenèse	12
3.4. Structure et morphologie du spermatozoïde	13
3.5. Sperme	14
3.6. Structure de l'ADN des spermatozoïdes	<u>1415</u>
3.7. Fragmentation de l'ADN spermatique	15
3.7.1. Causes de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes	16
3.7.1.1. Apoptose	15
3.7.1.2. Stress oxydatif	16
3.7.1.3. Maturation défectueuse	17
3.7.1.4. Age avancé	18
3.7.1.5. Varicocèle	18
3.7.1.6. Infections génitaux-urinaires	18

3.7.1.7. Pollution	18
3.7.1.8. Tabagisme	19
3.7.1.9. Obésité	19
3.7.1.10. Diabète	19
3.7.11. Rayonnements ionisants	19
3.7.2. Analyse de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes	20
3.7.2.1. SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)	20
3.7.2.2. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP Nick End Labelling)	20
3.7.2.3. Technique single cell electrophoresis (COMET)	21
3.7.2.4. SCD (Sperm Chromatin Dispersion)	22
3.7.3. Dans quels cas pratiquer le test	25 ²³
4. METHODOLOGIE	27 ²⁵
4.1. Cadre et lieu d'étude	27 ²⁵
4.2. Types d'étude et période de l'étude	27 ²⁵
4.3. Population d'étude	27 ²⁵
4.3.1. Critères d'inclusion	25
4.3.2. Critères de non-inclusion	26
4.4. Considérations éthiques	28 ²⁶
4.5. Collecte des données	28 ²⁶

4.5.1. Collècte des échantillons	<u>2826</u>
4.5.2. Données cliniques	<u>2927</u>
4.6. Méthodes	<u>2927</u>
4.6.1. Spermogramme	<u>2927</u>
4.6.3. Technique de fragmentation	<u>3533</u>
5. RESULTATS	39
5.1. Données cliniques	39
5.1.1. Age	37
5.1.2. Indications cliniques	38
5.1.3. Lieu de prélèvement	39
5.1.4. Durée d'abstinence	40
5.2. Données du spermogramme	38
5.2.1. Volume du sperme	38
5.2.2. Concentration des spermatozoïdes	44
5.2.3. Mobilité	43
5.2.4. Cellules rondes	44
5.2.5. Vitalité	45
5.2.6. Morphologie	47
5.2.7. Anomalies du Spermogramme	51
5.3. Données sur la fragmentation de l'ADN	53
5.3.1. Indice de fragmentation	51
5.3.2. Fragmentation spermogramme normaux	54

5.3.3. Fragmentation spermogramme anormal	56
5.4. Tableaux croisés	60
5.4.1. Vitalité et Fragmentation	58
5.4.2. Mobilité et fragmentation	59
5.4.3. Concentration et fragmentation	60
5.4.4. Morphologie et fragmentation	61
5.4.5. Spermogramme et fragmentation	62
6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION	66
7. CONCLUSION	72
8. RECOMMANDATIONS	74
10. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	77
10. ANNEXES	89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Répartition des individus en fonction de la durée d'abstinence.	42
Tableau II: Répartition des individus en fonction du volume du sperme	43
Tableau III: Répartition des individus en fonction des anomalies du spermogramme	52
Tableau IV: Répartition des individus selon l'indice de fragmentation de l'ADN (DFI)	54
Tableau V: Corrélation entre la vitalité et le taux de fragmentation	60
Tableau VI : Corrélation entre la motilité et le taux de fragmentation	61
Tableau VII: Corrélation entre la concentration et le taux de fragmentation	62
Tableau VIII: Corrélation entre la morphologie et le taux de fragmentation	63
Tableau IX: Corrélation entre le spermogramme et le taux de fragmentation	64

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Appareil génital masculin	6
Figure 2: Spermatogenèse.....	9
Figure 3: Etapes de la Technique SCD	23
Figure 4: SCA-SCOPE	24
Figure 5: Répartition des individus en fonction de l'âge.....	39
Figure 6: Répartition des individus en fonction de l'indication clinique	40
Figure 7: Répartition des individus en fonction du lieu de prélèvement.....	41
Figure 8: Répartition des individus selon la numération des spermatozoïdes	44
Figure 9: Répartition des individus en fonction de la mobilité	45
Figure 10: Répartition des individus en fonction de la concentration des cellules rondes	46
Figure 11: Image de spermatozoïdes	47
Figure 12: Répartition des individus en fonction de la vitalité	48
Figure 13: Morphologie des spermatozoïdes	49
Figure 14: Répartition des individus en fonction de la morphologie	50
Figure 15: Répartition des individus en fonction du résultat du spermogramme....	51
Figure 16: Fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes	53

Figure 17: Distribution des valeurs de la fragmentation de l'ADN après le test de dispersion de la chromatine de la population d'étude.55

Figure 18 : Distribution du taux de fragmentation d'ADN chez les individus présentant un spermogramme normal.....56

Figure 19 : Distribution des valeurs de la fragmentation d'ADN des individus avec spermogrammes normaux.....57

Figure 20: répartition en pourcentage de la fragmentation d'ADN des individus présentant spermogrammes anormaux.....58

Figure 21: Distribution des résultats des fragmentations des individus avec spermogramme anormaux.....59

LISTE DES ABREVIATIONS

8OHdG : 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine

ADN: Acide Désoxyribonucléique

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DFI: DNA Fragmentation Index

DRO: Dérivés Réactifs de l'oxygène

FIV: Fecondation In Vitro

ICSI: Intracytoplasmic Sperm Injection

MDA: Malondialdehyde

OATS: Oligo-Asthéno-Tératozoospermie

OMS: Organisation mondiale de la santé

PBS: Phosphate Buffer Saline

PH: Potentiel d'hydrogène

PMA: Procréation médicalement assistée

SA: Spermogramme Anormal

SCD: Sperm Chromatin Dispersion

SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay

SDF: Sperm DNA Fragmentation

SN: Spermogramme Normal

TdT: Terminal desoxynucleotidyl Transferase

TNF: Tumor Necrosis Factors

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated d'UTP Nick End Labelling

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

L'infertilité est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme l'incapacité d'un couple à obtenir une grossesse évolutive après plus d'une année de rapports sexuels réguliers, non protégés et sans contraception. L'infertilité est un problème majeur de santé publique car elle touche environ 48 millions de couples et 186 millions de personnes dans le monde (1).

L'Afrique est le continent le plus touché par l'infertilité. En effet, 15 à 30% des couples africains rencontrent des difficultés à concevoir (contre 5 à 10% pour le reste du monde) (1). Dans un continent où la virilité de l'homme est souvent confondue avec la capacité à faire des enfants, l'infertilité masculine reste un sujet tabou. Longtemps considérée comme un problème purement féminin, aujourd'hui, il a été démontré que l'infertilité masculine se révèle être la cause d'un tiers de celle du couple (1).

Les causes de l'infertilité masculine sont multiples, et la fragmentation de l'ADN spermatique est considérée comme l'une des plus fréquentes. De multiples études portant sur l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes ont mis en évidence un taux d'ADN fragmenté plus élevé dans les spermatozoïdes d'hommes infertiles (2,3). En outre, il a été rapporté qu'un niveau élevé de fragmentation de l'ADN spermatique peut compromettre la conception (naturelle ou par les techniques de procréation médicalement assistée) (4). Les dommages à l'ADN spermatique peuvent entraîner des fragmentations et sont associés à plusieurs facteurs, notamment les facteurs extrinsèques tels que l'exposition à la chaleur, le tabagisme, les infections urogénitales, une inflammation, la varicocèle, la cryptorchidie, les radiations ionisantes, les polluants environnementaux, et la chimiothérapie. Et les facteurs intrinsèques comme une maturation défectueuse des cellules germinales, le

stress oxydatif, un excès de stress au quotidien et des carences micro-nutritionnelles peuvent aussi être associés à une fragmentation de l'ADN spermatique (5).

L'exploration de l'infertilité masculine reste avant tout basée sur l'analyse conventionnelle du sperme : le spermogramme et le spermocytogramme. Toutefois, l'évaluation de la concentration, la motilité, la vitalité et la morphologie des spermatozoïdes ne peut pas refléter l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes. C'est ainsi qu'on retrouve chez 15% des individus infertiles une analyse normale du sperme (6). Par conséquent, l'analyse conventionnelle du sperme ne peut pas prédire avec précision le potentiel de la fertilité masculine. Pour combler cette limite du spermogramme, on a recours à d'autres techniques qui évaluent le nombre de chromosomes et l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes (7).

La technique de dispersion de la chromatine des spermatozoïdes (SCD) est l'une des approches les plus utilisées dans la pratique clinique pour évaluer la fragmentation de l'ADN spermatique. En effet, les spermatozoïdes ayant de l'ADN fragmenté à plus de 30%, mesuré par la technique SCD, ont très peu de pouvoir fécondant et conduisent à des avortements spontanés (8). Malgré sa place prépondérante dans l'évaluation du pouvoir fécondant des spermatozoïdes et du bilan de l'infertilité masculine, la technique SCD n'est pas encore pratiquée au Mali. La présente étude consiste à d'abord faire la mise au point de la technique du test de dispersion de la chromatine des spermatozoïdes (SCD) et ensuite d'évaluer le taux de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes au Mali. Cette étude nous permettra donc de mesurer, pour la première fois au Mali, le taux de fragmentation de l'ADN spermatique des hommes consultant pour une infertilité afin d'améliorer leur prise en charge.

OBJECTIFS

2. OBJECTIFS

2.1 Objectif général

Déterminer le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes chez les hommes consultant pour une infertilité.

2.2 Objectifs spécifiques

- Effectuer la mise au point de la technique SCD au laboratoire au Mali.
- Appliquer la technique de dispersion de la chromatine spermatique (SCD) sur les spermatozoïdes des hommes consultant pour une infertilité.
- Évaluer la fréquence de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.
- Corréler les données de fragmentation de l'ADN à celles du spermogramme.

3. GENERALITES

3.1. Rappel anatomique du système reproducteur male

L'appareil génital de l'homme comprend différents organes.

3.1.1. Testicules

Ils sont situés dans les bourses droite et gauche, coiffés par l'épididyme. Ils sont divisés en lobules et contiennent des canalicules, des tubes séminifères et des cellules de Sertoli. Les testicules ont une fonction endocrine qui se traduit par la sécrétion d'hormones sexuelles, essentiellement la testostérone, et une fonction exocrine qui se manifeste par la production des spermatozoïdes (9).

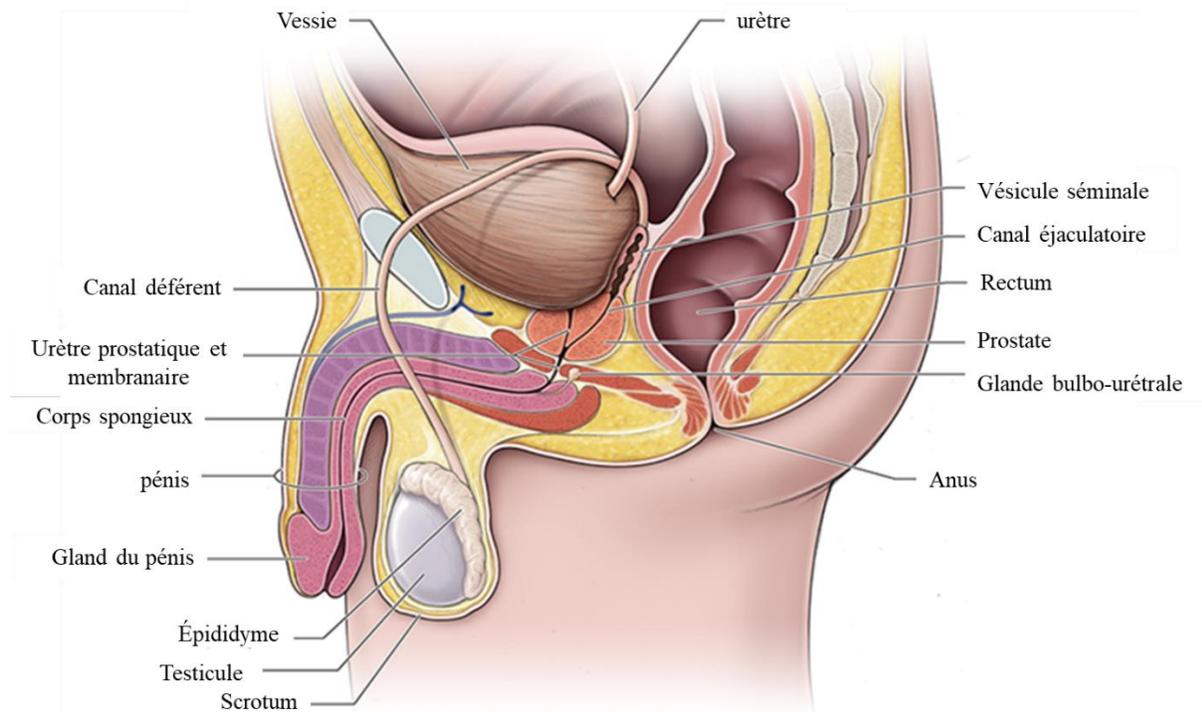


Figure 1: Coupe transversale de l'appareil génital masculin. Vue distale
Cette figure a été tirée et modifiée de la référence (10).

3.1.2. Épididyme (organe paire)

Elle coiffe le testicule et est constituée d'une tête, à la partie supérieure un corps qui commence à s'éloigner et d'une queue détachée du testicule. L'épididyme sert de lieu de maturation des spermatozoïdes.

3.1.3. Conduit déférent

Il mesure environ 40 cm et possède un diamètre de 2 à 3mm. Il part du pôle inférieur du testicule et se termine par un renflement (l'ampoule déférentielle) sur lequel s'abouche la vésicule séminale. C'est la voie par laquelle les spermatozoïdes quittent l'épididyme pour rejoindre les vésicules séminales.

3.1.4. Vésicules séminales

Elles sont situées à l'arrière de la vessie et au-dessus de la prostate et interviennent dans la production du liquide séminal qui est le composant majoritaire du sperme.

3.1.5. Prostate

Elle est localisée sous la vessie et entoure le carrefour uro-génital. La prostate sécrète un liquide acide (le liquide prostatique) qui joue un rôle complémentaire en modifiant le pH des sécrétions séminales.

3.1.6. Canal éjaculateur

Il se situe dans la partie supérieure de la prostate. Au cours de l'éjaculation, le sperme passe par ce conduit pour ensuite emprunter l'urètre et finalement sortir par l'extrémité distale du pénis.

3.1.7. Pénis

Le pénis est l'organe de la copulation chez l'homme, il est situé en avant de

la symphyse pubienne et au-dessus des bourses. Il est constitué de trois corps érectiles dont deux corps caverneux et un corps spongieux dans lequel se trouve l'urètre. Le corps spongieux se dilate à son extrémité formant ainsi le gland du pénis qui est recouvert d'une peau fine et mobile appelé le prépuce.

3.2. Spermatogenèse

La spermatogenèse est le processus biologique par lequel les cellules germinales appelées spermatogonies se transforment progressivement en spermatozoïdes. Chez l'homme, elle débute à partir de la puberté et se poursuit toute la vie. La spermatogénèse se déroule principalement à l'intérieur des tubes séminifères des testicules. Elle se déroule en trois phases : la phase de prolifération des spermatogonies, la phase méiotique ou phase de maturation et la phase de différenciation ou spermiogénèse.

3.2.1. Phase de prolifération des spermatogonies

Les spermatogonies A sont les cellules souches diploïdes situées à la base de l'épithélium séminifère, elles subissent une succession de mitoses dont la première aboutit à la formation des spermatocytes I. Elles s'auto-renouvellent également et assurent le maintien des cellules germinales. Sur le plan morphologique on distingue trois types de spermatogonies (9 ,11) :

-Les spermatogonies A (ou poussiéreuses), à noyau homogène et finement granuleux sont de deux sortes : les spermatogonies Ap (pale) à noyau clair et les spermatogonies Ad (dark) à noyau plus dense.

-Les spermatogonies de type B appelées crotelleuses à noyau pourvu de chromocentres très nets qui se multiplient par mitose en spermatocyte I. Cette phase dure environ 27 jours.

La phase de multiplication a donc deux objectifs. D'une part, elle assure le maintien d'un pool de spermatogonies souches et d'autre part, elle entretient le développement de la lignée germinale grâce aux divisions.

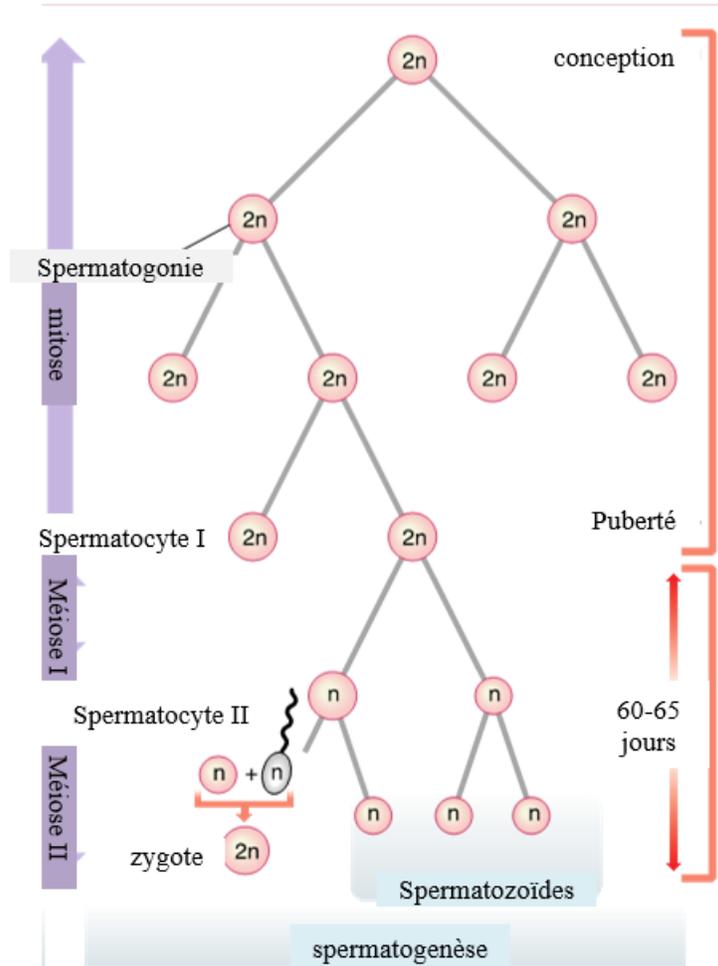


Figure 2: Spermatogénèse

Cette figure a été tirée et modifiée du site web ayant la référence (12).

3.2.2. Phase de maturation

C'est la phase durant laquelle les spermatocytes subissent la méiose c'est-à-dire deux divisions successives qui vont entraîner la réduction de moitié du nombre de chromosomes et la quantité d'ADN.

3.2.2.1. Première division de méiose

La première division méiotique est une division réductionnelle. Chaque spermatocyte I (46 chromosomes, deux chromatides) se divise pour donner deux spermatocytes II (23 chromosomes, deux chromatides) et cette première division dure environ 22 jours. Elle est caractérisée par une prophase longue qui comprend cinq stades successifs : les stades leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse (9,11).

Au stade leptotène, les chromosomes s'individualisent et forme de longs filaments. Chaque chromosome est répliqué et donc constitué de deux chromatides sœurs attachées par un centromère. Au stade zygotène, les chromosomes homologues forment des paires. Chaque paire d'homologue appariée forme un bivalent composé de quatre chromatides entraînant la formation des complexes synaptonémaux. Au stade pachytène, les chromosomes se raccourcissent et s'épaississent. C'est à ce stade que débute les échanges de matériel génétique entre chromatides homologues (ou recombinaison, ou crossing over). Au stade diplotène les homologues de chaque bivalent commencent à se séparer tout en restant collés à certains endroits appelés chiasma. Au stade de la diacinèse, la condensation des chromosomes devient maximale permettant ainsi l'identification des quatre chromatides, des centromères et des chiasmas.

La métaphase I fait suite à cette étape. Au cours de celle-ci, l'enveloppe nucléaire disparaît et le fuseau se forme. Les centromères homologues de chaque

bivalent se disposent de part et d'autre du plan équatorial. A l'anaphase I les centromères homologues migrent vers les deux pôles opposés et les couples de chromosomes homologues sont disjoints. A la télophase I les enveloppes nucléaires se reconstituent autour des noyaux des cellules filles et une cytotélerèse se suit. Les cellules filles contiennent 23 chromosomes, un de chaque paire. Chaque chromosome est dupliqué et constitué de deux chromatides sœurs.

3.2.2.2. Deuxième division de méiose

La deuxième division méiotique est de type équationnel. C'est la phase au cours de laquelle les spermatocytes II se divisent et forment chacun deux spermatides (23 chromosomes, une chromatide). Cette phase est très rapide d'autant qu'elle dure moins de 48 heures. Par conséquent, elle explique le fait que les spermatocytes II soit très rarement observés sur les coupes histologiques. A la prophase II, le fuseau se reforme et les chromosomes se disposent sur la plaque équatoriale. A l'anaphase II, les centromères se divisent et les chromatides sœurs se séparent. La membrane cellulaire se reconstitue autour des cellules filles. Ainsi, chez l'homme une spermatogonie conduit à la formation de 4 spermatozoïdes.

Les anomalies de la répartition des chromosomes telles que les non-disjonctions peuvent survenir au cours de la méiose. La méiose crée une très grande diversité génétique par la répartition au hasard des chromosomes.

3.2.3. Phase de différenciation ou spermiogénèse

C'est le processus par lequel les spermatides se transforment en spermatozoïdes capables de se déplacer et de féconder. Au cours de ce processus, les spermatides subissent plusieurs changements notamment (9,11).

- La condensation de la chromatine nucléaire avec des protéines du noyau forment la tête du spermatozoïde.

-
- La formation du flagelle qui permet la mobilité du spermatozoïde.
 - La formation de l'acrosome qui est très riche en enzymes hydrolytiques indispensables aux spermatozoïdes pendant leurs interactions avec l'ovocyte lors de la fécondation.
 - L'élimination de l'excès de cytoplasme des spermatides qui est versé comme corps résiduel et phagocyté par les cellules de Sertoli.
 - La formation du manchon mitochondrial de la pièce intermédiaire. Les mitochondries d'abord dispersées dans le cytoplasme se regroupent pour former un manchon.
 - Les modifications membranaires et la synthèse des protéines cytoplasmiques indispensable au déroulement de la fécondation.

Après ces changements morphologiques, les spermatozoïdes, pas encore mobiles, quittent l'épithélium séminifère pour achever leur maturation dans l'épididyme. On parle de maturation épидидymaire. L'ensemble de toutes ces phases dure environ 74 jours, c'est pourquoi il est recommandé d'espacer les spermogrammes de trois mois chez le même sujet.

3.3. Contrôle hormonal de la spermatogenèse

Le contrôle de la fonction reproductive masculine est assuré par plusieurs hormones dont la sécrétion est régulée par des boucles de rétrocontrôle négatif. L'hypothalamus synthétise la GnRH (Gonadotropin-releasing Hormone) qui gagne l'antéhypophyse par le système porte hypophysaire. Cette hormone stimule la libération des gonadotrophines FSH (hormone folliculostimulante) et LH (hormone lutéinisante) qui agissent sur leurs sites testiculaires. La LH a des récepteurs sur les cellules de Leydig et induit la synthèse d'hormones stéroïdes, d'androgènes en particulier la testostérone. La FSH induit la spermatogénèse par ses effets sur les

cellules de Sertoli. Elle induit également la synthèse d'inhibine, d'une protéine transporteuse de testostérone, ABP (Androgen Binding Protein) et de nombreuses autres substances. Ainsi, la concentration de testostérone dans les testicules est élevée, condition nécessaire à la spermatogénèse. La testostérone circulante exerce un rétrocontrôle négatif en inhibant la sécrétion hypothalamique et antéhypophysaire (9,11).

3.4. Structure et morphologie du spermatozoïde

Le spermatozoïde est une petite cellule mesurant $3\mu\text{m}$ de large et $60\mu\text{m}$ de long, formés de trois parties principalement : la tête, le col et le flagelle.

3.4.1. Tête

Elle est constituée d'un noyau et d'un acrosome. Le noyau occupe la majeure partie de la tête et il contient le matériel génétique extrêmement condensé. Il est recouvert sur ses deux tiers antérieurs par l'acrosome. L'acrosome est une vésicule aplatie qui recouvre les $2/3$ supérieurs du noyau. Il contient de nombreuses enzymes hydrolytiques comme la glucuronidase, hyaluronidase, phosphatase acide, N-acetylglycosaminidase, protéinases neutres etc. Ces enzymes permettront aux spermatozoïdes de traverser les enveloppes de l'ovocyte.

3.4.2. Col

Il est la zone de jonction entre la tête et le flagelle, composé d'un appareil centriolaire et d'une pièce connective.

3.4.3. Flagelle

A partir du col, on distingue sur sa longueur trois parties notamment la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. Le flagelle grâce à ses mouvements ondulatoires permet aux spermatozoïdes de se déplacer.

3.5. Sperme

Le sperme est un liquide blanchâtre, d'aspect gélatineux, produit par l'appareil génital masculin lors de l'éjaculation et contenant les spermatozoïdes en suspension dans un liquide qui est un mélange des sécrétions des différentes glandes génitales male. Il contient également de nombreuses cellules souches, cellules épithéliales, macrophages, polynucléaires, hormones de croissance, sucres (fructose et sorbitol), protéines, et oligoéléments. Le sperme est normalement stérile, c'est-à-dire sans germes. Selon l'OMS, le volume normal du sperme est compris entre 1,5-7 ml. Ce volume avec une densité en spermatozoïdes supérieure à 15 millions de spermatozoïdes par millilitre est considéré comme normalement fécondant. Par conséquent, des valeurs inférieures à la norme ne sont pas toujours synonymes de stérilité. De nombreuses pathologies peuvent atteindre la qualité du sperme, dont la conséquence principale est un risque de stérilité. Les examens permettant d'étudier la qualité du sperme sont le spermogramme et le spermocytogramme (9,11).

3.6. Structure de l'ADN des spermatozoïdes

L'ADN du gamète mâle, est une longue molécule fortement compactée. L'ADN des spermatozoïdes est le plus densément compacté connu chez les eucaryotes pouvant être plus de six fois plus condensé que celui des cellules somatiques. Au cours de la spermiogénèse, les nucléoprotéines de types histones sont remplacées par des protamines. La condensation de l'ADN est assurée par ces dernières qui sont des protéines nucléaires se trouvant dans les petits sillons de la double hélice de l'ADN. Deux protamines successives sont unies par des ponts disulfures. Ce processus permet au noyau des spermatozoïdes de se condenser et de devenir mature. Cette compaction très importante correspond à la mise en place d'une protection du noyau du gamète aux différentes agressions auxquelles il va être

soumis tout au long de son trajet, du tube séminifère jusqu'au cytoplasme ovocytaire. Elles permettent aussi une augmentation de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes à travers les liquides et diminuent l'apparition des dommages à l'ADN. En effet, l'altération de la quantité des protamines provoque une condensation incomplète de la chromatine spermatique capable d'induire des dommages à l'ADN qui pourront ensuite être à l'origine des avortements spontanés ou des échecs du développement embryonnaire à la suite d'une ICSI (13,14).

3.7. Fragmentation de l'ADN spermatique

L'évaluation des hommes infertiles repose toujours sur l'analyse conventionnelle du sperme, bien qu'elle ne prédise pas à elle seule avec précision le potentiel de fertilité masculine et le succès des techniques de procréation assistée (14). Ces dernières années, il est devenu clair que le sperme des hommes rencontrant des difficultés à concevoir peut avoir des niveaux élevés de spermatozoïdes avec un ADN endommagé ou fragmenté (16-19). La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes désigne les cassures simple brin ou double brin dans le génome des spermatozoïdes. Les dommages à l'ADN des spermatozoïdes sont associés à une infertilité masculine et diminuent les probabilités de conception à la fois naturelle qu'assistée (20-22). En outre, la fragmentation de l'ADN peut être associée à des résultats de spermogramme et spermocytogramme normaux. Environ 15% des patients infertiles ont un spermogramme normal (23). Il a été suggéré que l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes est un marqueur plus objectif de la fonction de ceux-ci par opposition aux paramètres standards tels que leur motilité (24,25). Des études ont également montré une relation entre les dommages à l'ADN des spermatozoïdes et le taux de réussite des fécondations *in vitro* (26). De plus, un rapport a indiqué que les niveaux de dommages à l'ADN des spermatozoïdes $\geq 30\%$ sont incompatibles avec la réalisation d'une grossesse naturelle (27).

3.7.1. Causes de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes

L'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes peut être affectée au cours de la spermatogenèse. Habituellement, le taux de fragmentation est faible dans les spermatozoïdes, mais pour des raisons diverses les brins d'ADN spermatique présentent des cassures excessives. Plusieurs facteurs intrinsèques (maturation défectueuse des cellules germinales, apoptose abortive, stress oxydatif) et extrinsèques (exposition à la chaleur, tabagisme, polluants environnementaux, produits chimio thérapeutiques) peuvent entraîner la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

3.7.1.1. Apoptose abortive pendant la spermatogenèse

L'homéostasie cellulaire est régulée par le développement et la différenciation des cellules mais également par la mort cellulaire programmée : l'apoptose. L'apoptose est indispensable lors d'une spermatogenèse fonctionnelle dans le testicule. Elle intervient dans le maintien du nombre de cellules germinales par rapport au nombre de cellules de Sertoli. L'apoptose extrinsèque est déclenchée par la liaison du ligand FAS à un récepteur FAS activant ainsi la caspase 8 ou 10 (28). Il en résulte alors une cascade d'activation protéiques aboutissant à la mort cellulaire et la fragmentation de l'ADN. FAS est une protéine transmembranaire appartenant à la super famille des récepteurs TNF et le système FAS-FAS Ligand joue un rôle important dans l'élimination des cellules germinales apoptotiques dans les testicules humains. L'apoptose garantie donc qu'aucune cellule germinale défectueuse ne se différencie en spermatozoïde, mais l'échec de ce processus peut entraîner l'accumulation des spermatozoïdes exprimant des marqueurs apoptotiques dans le sperme éjaculé. La présence des spermatozoïdes présentant des traits apoptotiques

et une fragmentation de l'ADN suggèrerait alors qu'un processus d'apoptose a été déclenché mais qu'il n'a pas atteint son but ultime.

3.7.1.2. Stress oxydatif

Il entraîne la production des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) encore appelés radicaux libres oxygénés. Ce sont des molécules très instables. On distingue les DRO sous forme ionique (l'ion hydroxyle OH⁻, l'ion superoxyde O₂⁻), et sous formes de molécules (le peroxyde d'hydrogène-H₂O₂, l'acide hypochlorique-HOCL, le peroxyde de lipides-LOOH et l'ozone-O₃). Ce sont des produits du métabolisme cellulaire qui joueraient un rôle important dans le processus physiologique des spermatozoïdes. Lorsqu'ils sont présents à des concentrations élevées, ils sont capables d'entraîner des altérations au niveau de la membrane des spermatozoïdes qui est très riche en acide gras polyinsaturés, très vulnérable à l'oxydation et à la peroxydation lipidique (29). Les DRO dans le plasma séminal proviennent de diverses sources notamment les leucocytes (une leucospermie c'est à dire la présence de plus de 1 millions de cellules à peroxydase positive par ml de sperme génère un DRO capable d'endommager les spermatozoïdes), les cellules germinales immatures, le tabagisme, l'alcool et les polluants environnementaux (30). De plus, la fragmentation peut être provoquée par des DRO indirectement par l'intermédiaire de sous-produits lipidiques tel que le 4-hydroxynonenol (4HNE) et le malondialdéhyde (MDA), qui produisent des adduits d'ADN tels que le 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG) entraînant des dommages à l'ADN en particulier sur les sites où la protamination est faible. Il est important de noter que la plupart des dommages de l'ADN spermatique est induite par le stress oxydatif (31, 32).

3.7.1.3. Maturation défectueuse

Au cours du processus normal de compactage de la chromatine des spermatozoïdes, les cassures d'ADN qui ne sont pas réparées entraînent la formation d'ADN moins compact qui est susceptible d'être endommagé par des facteurs exogènes. Au cours de la spermatogenèse, la chromatine est compactée par échange d'histones avec des protéines de transition et des protamines (30). Ceci est facilité par la nucléase endogène topoisomérase II qui créent des cassures d'ADN pour réduire le stress de torsion afin d'assurer le désassemblage des histones et l'emballage de la chromatine (31,32). Si ces cassures ne sont pas réparées, une altération de l'emballage de la chromatine peut entraîner une maturation défectueuse et l'apparition de spermatozoïdes avec un taux de fragmentation élevé dans l'éjaculat (33,34).

3.7.1.4. Âge avancé

La fragmentation augmente avec l'âge. Commenant en âge de procréer et doublant entre 20 et 60 ans (35). Ceci serait causé par une exposition élevée au stress oxydatif, une maturation défectueuse et l'apoptose qui se produisent avec le vieillissement

3.7.1.5. Varicocèle

Elle induit des lésions testiculaires par la dilatation des veines. La fragmentation de l'ADN est la résultante de l'augmentation de la température intra-testiculaire et le flux rétrograde des métabolites rénaux et surrénaliens, ce qui entraîne le stress oxydatif et l'apoptose (36).

3.7.1.6. Infections génitaux urinaires

Les infections génito-urinaires et la leucocytospermie subséquente entraînent la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

3.7.1.7. Pollution

Certains produits chimiques peuvent endommager l'ADN des spermatozoïdes. Certaines études démontrent une augmentation du SDF avec la pollution atmosphérique (37). L'exposition à des métaux lourds tels que le plomb, le cadmium (38), le fenvalérate (insecticide synthétique) (39) et les pesticides organophosphorés (40) peuvent causer des dommages à l'ADN des spermatozoïdes. Le bisphénol A et le styrène présent dans le caoutchouc synthétique ou les polyesters altèrent également l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes (41).

3.7.1.8. Tabagisme

Les hommes fumeurs ont un sperme de moins bonne qualité. Le tabagisme a un impact négatif sur l'intégrité de l'ADN en raison des métabolites du tabac, tels que la nicotine, le cadmium, le plomb et le benzopyrène (42).

3.7.1.9. Obésité

Les hommes obèses ont des niveaux plus élevés de stress oxydatif et de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes par rapport aux hommes de poids normal ou en surpoids (43). L'augmentation de la température du scrotum et les troubles endocriniens sont considérés comme les mécanismes liant l'obésité à l'altération de la fonction des spermatozoïdes et la fertilité.

3.7.1.10. Diabète

Les hommes atteints de diabète présentent des niveaux plus élevés de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes à cause des DRO en association avec

les produits finaux de glycation avancée qui sont des substances issues en générale de la réaction entre un sucre et des résidus de protéines (44).

3.7.1.11. Rayonnements ionisants

Les produits chimiques génotoxiques, les médicaments radiomimétiques peuvent également conduire à une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Les ondes électromagnétiques, en particulier celles des téléphones cellulaires, augmentent la production des substances oxygénées réactives mitochondriaux et la formation d'adduits à l'ADN, causant des dommages à l'ADN (45).

3.7.2. Analyse de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes

Différentes techniques peuvent être utilisées pour évaluer la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

3.7.2.1. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

Le SCSA est une technique de cryométrie de flux qui permet la quantification de la fluorescence émise par les brins d'ADN (21). En effet, la chromatine spermatique fragmentée est susceptible de se dénaturer après un traitement par une solution acide ou par la chaleur, tandis qu'une chromatine normale reste intacte. La chromatine pourrait être colorée avec de l'acridine orange qui possède des propriétés métachromatiques. Ainsi, l'ADN double brin produit une fluorescence verte, l'ADN simple brin dénaturé produit une fluorescence rouge. La cytomètre de flux permet de mesurer la fluorescence dans environ 5000 spermatozoïdes et de déterminer le « DNA Fragmentation Index » ou l'index de fragmentation de l'ADN (DFI) (46).

3.7.2.2. Test de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labelling)

Le principe de cette technique repose sur la liaison spécifique de TdT (Terminal desoxynucleotidyl-transférase) aux extrémités 3-OH de l'ADN suivie de la synthèse d'une molécule polydesoxynucleotidique marquée. L'ADN est d'abord dénaturé par un traitement protéolytique, puis la TdT est utilisée pour incorporer les nucléotides triphosphates aux sites de cassures de l'ADN permettant ainsi de quantifier les niveaux de cassures. Des nucléotides sont couplés à la digoxygénine et un anticorps antidigoxygénine couplé à un fluorochrome qui permet l'observation au microscope. L'analyse peut se faire à l'aide d'un microscope à épifluorescence ou par cytométrie de flux (si la concentration spermatique n'est pas trop faible) (47,48)

3.7.2.3. « Technique Single Cell Gel Electrophoresis COMET » ou Test de COMET

Cette méthode est capable de mesurer à la fois les cassures simples et doubles brins d'ADN des spermatozoïdes. Le sperme est mélangé avec de l'agarose légèrement chauffé, le tout est déposé sur une lame. Les cellules sont ensuite lysées afin de dissoudre la membrane cellulaire pour rendre la chromatine accessible. Ensuite, la lame est trempée successivement dans deux solutions enzymatiques. Ces deux étapes sont cruciales car elles permettent la décondensation de la chromatine des spermatozoïdes. Après ces étapes, les gamètes sont soumis à une électrophorèse. Le spermatozoïde est soumis à un champ électrique, l'ADN sans cassure reste dans la tête spermatique intacte et super enroulé. Au contraire, si l'ADN a des cassures, il migre et sort petit à petit de la tête spermatique et donne ainsi l'aspect d'une comète (d'où le nom de la technique). Le test combine l'analyse de l'échantillon de

sperme dans des conditions de pH neutre et de pH alcalin (pH > 10). Le test alcalin des comètes visualise les cassures simples et double brin de l'ADN cellulaire, tandis que le test neutre des comètes révèle principalement les cassures double brin. Enfin, même si cette technique détecte les cassures de l'ADN spermatique il n'a pas été établi de seuil à partir duquel un impact clinique existe (49).

3.7.2.4. Test SCD (Sperm Chromatin Dispersion)

Le test SCD a été utilisé pour la première fois en 2003 par l'équipe de Fernandez (50). Le test de dispersion de la chromatine des spermatozoïdes (SCD), ou test "halo" évalue le pourcentage des spermatozoïdes ayant de l'ADN fragmenté à l'aide de la microscopie (à fluorescente ou fond clair). Les spermatozoïdes sont immergés dans une matrice d'agarose et lysés pour éliminer la membrane cellulaire, le cytoplasme et le nucléoplasme. Les cellules sont ensuite traitées avec une solution d'acide pour solubiliser les protéines de l'emballage nucléaire, ce qui permet à l'ADN intact qui est étroitement compacté de jaillir vers l'extérieur, ressemblant à une structure en forme de halo autour du noyau. L'ADN est ensuite coloré avec un marqueur nucléaire (4',6-diamindino-2-phénylindole-DAPI ou Diff-Quick) pour l'observation microscopique. Les spermatozoïdes sont évalués et classés en fonction de la taille du halo (50,51). Les spermatozoïdes avec un ADN intact forment de grands halos de dispersion autour du noyau, par contre les spermatozoïdes avec un ADN fragmenté ne produisent pas de halos ou forme de petits halos de dispersion. Le DFI (DNA Fragmentation Index) est par la suite évalué. Un échantillon de sperme normal possède un DFI inférieur à 15%. Un DFI compris entre 15-30% est considéré comme modéré, et les hommes qui ont un DFI dans cette fourchette nécessitent un avis spécialisé pour comprendre comment améliorer la qualité du sperme. Un DFI supérieur ou égale à 30% a un impact négatif sur le potentiel de fertilité des spermatozoïdes (50,5).

La technique de dispersion de la chromatine des spermatozoïdes

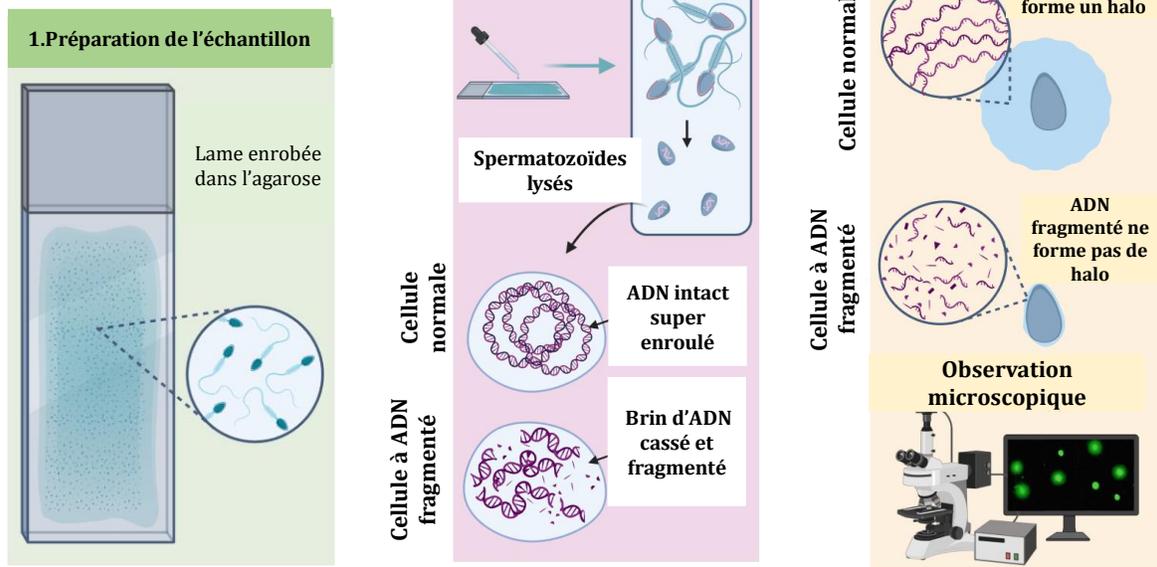


Figure 3: Etape de la Technique SCD

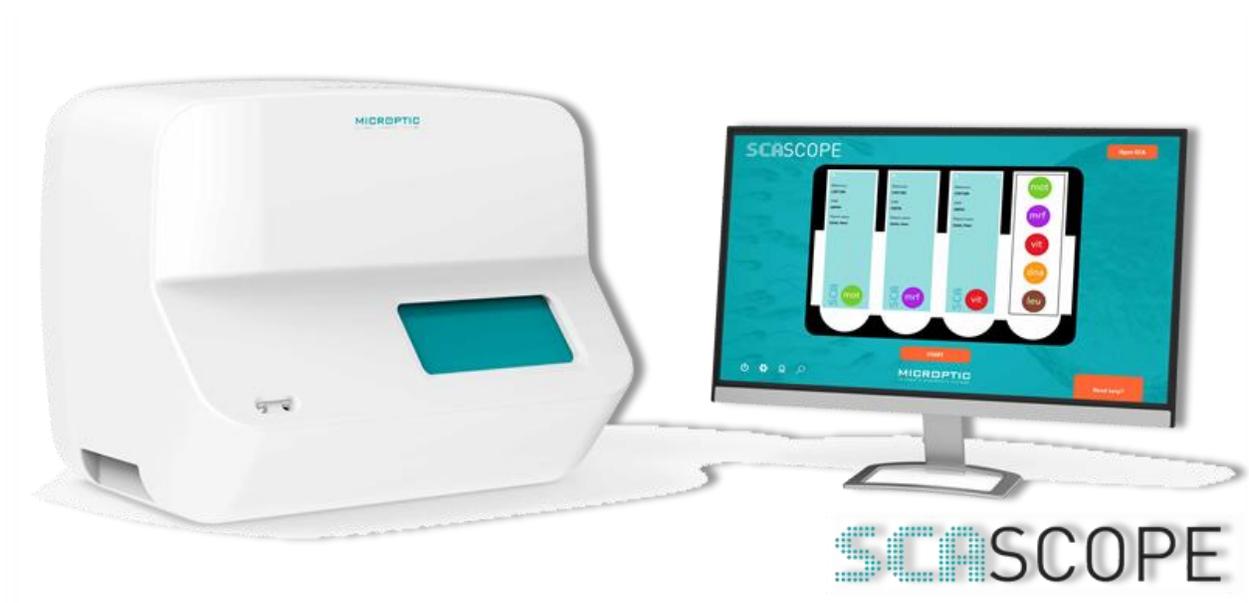


Figure 4: SCA-SCOPE

Le SCA SCOPE est un équipement de laboratoire de la société MICROPTIC SL située à Barcelone (Espagne) pour l'analyse du sperme et qui comprend à la fois une partie logicielle et une partie matérielle (microscope et caméra). Ainsi, l'analyse peut être effectuée de manière autonome, automatique et rapide.

3.7.3. Dans quels cas pratiquer le test

Le test de fragmentation de l'ADN spermatique est préconisé dans les cas suivants :

- Absence de grossesse après 1 an de rapports sexuels non protégés
- Échecs répétés d'implantation en FIV ou en ICSI
- Fausses couches à répétition
- Infertilité masculine inexpliquée
- Varicocèle
- Infections génito-urinaires
- Patients âgés de plus de 45 ans
- Patients fumeurs ou exposés à des substances toxiques
- Exposition à de hautes température

METHODOLOGIE

4. METHODOLOGIE

4.1. Cadre et lieu d'étude

Le but de cette étude était de démontrer l'intérêt de l'utilisation de la technique de fragmentation Sperm Chromatin Dispersion (SCD) comme technique complémentaire aux analyses de spermogramme et spermocytogramme, et permettre une meilleure appréciation de la qualité des gamètes mâles même lorsque les résultats du spermogramme et du spermocytogramme semblent normaux.

Tous les patients ont été recrutés dans le laboratoire ALGI, lors de l'analyse de leur spermogramme. Le laboratoire ALGI est une structure privée située à Bamako. A notre connaissance, c'était cette seule structure qui disposait de l'appareillage pour mesurer la fragmentation de l'ADN spermatique par la technique SCD.

4.2. Type d'étude et période de l'étude

Il s'agissait d'une étude prospective et descriptive qui s'est déroulée sur une période de dix-huit mois allant du 1^{er} juillet 2021 au 31 Décembre 2022.

4.3. Population d'étude

La population d'étude était constituée des patients se présentant au laboratoire pour un bilan d'infertilité masculine avec une demande d'examen de spermogramme et spermocytogramme.

4.3.1 Critères d'inclusions

Nous avons inclus dans l'étude des patients qui présentaient des spermogramme et spermocytogramme normaux et aussi des patients avec des spermogramme et spermocytogramme anormaux.

4.3.2. Critères de non-inclusions

Tous les patients avec une azoospermie et ceux qui avaient des paramètres spermatiques profondément effondrés (Oligo--asthénozoospermie sévère ou une cryptozoospermie) n'ont pas été inclus dans l'étude.

Nous avons recruté 51 patients pour cette étude.

4.4. Considérations éthiques

Étant donné que nous devrions recueillir des données cliniques et génomiques des patients, il était judicieux que ces derniers consentent à l'étude avant la collecte des données. Par conséquent, chaque patient a bénéficié d'une explication de l'étude. Le but de cette explication était de s'assurer que chaque patient ait compris les détails et les points importants qui sont : le caractère volontaire, la possibilité de se retirer de l'étude à tout moment, le but, les critères de participation, les procédures et les risques liés à la participation à l'étude.

4.5. Collecte des données

4.5.1. Collecte des échantillons

Nous avons collecté 1 ml de sperme à partir du sperme utilisé pour l'analyse du spermogramme. Les échantillons ont été collectés chez les 51 individus inclus dans cette. Le recueil du sperme a été réalisé par les patients eux-mêmes (certains ont effectué le recueil au laboratoire et d'autres à la maison). Le recueil s'effectuait par masturbation dans un récipient, à usage unique, stérile avec couvercle après une abstinence sexuelle de 2 à 5 jours. Les patients devaient uriner avant de procéder au recueil afin d'éliminer les germes présents dans le canal de l'urètre et aussi bien se laver les mains et la verge. Une fois le recueil effectué l'éjaculat était placé à la

température de la pièce (20-25°C) pour liquéfaction (20 minutes). Après la liquéfaction l'échantillon était rapidement analysé.

4.5.2. Données cliniques

Nous avons collecté les données cliniques de chaque patient et une base de données Excel nous a permis de classer ces données.

4.6. Méthodes

4.6.1. Spermogramme

Le spermogramme est l'examen qualitatif et quantitatif du sperme et des spermatozoïdes. C'est le premier examen pratiqué sur le sperme dans le cadre du bilan d'infertilité masculine. Il permet de préciser différents paramètres dont les principaux indicateurs de la fertilité masculine : la concentration, la motilité, la vitalité des spermatozoïdes et également l'activité sécrétoire à travers le volume, le pH et la viscosité du sperme. Le spermogramme a été effectué conformément aux directives du manuel de l'OMS (52).

4.6.1.1. Conditions de recueil

Il est très important de transmettre aux patients des instructions claires avant le recueil de l'échantillon pour garantir le bon déroulement de l'analyse. Il est essentiel de s'assurer que le patient comprenne ces instructions. Si le patient recueille son sperme à la maison il faut lui faire comprendre l'importance de faire parvenir l'échantillon dans l'heure qui suit le prélèvement au laboratoire. Mais il serait préférable d'encourager le patient à faire le recueil au laboratoire. Toutes conditions susceptibles de modifier la qualité de l'échantillon doivent être consignées. Une abstinence comprise entre 2 à 5 jours est recommandée pour éviter le recueil d'un faible volume d'éjaculat ou un volume contenant deux fois la

concentration normale de spermatozoïdes avec un pourcentage élevé de spermatozoïdes morts due à une abstinence trop longue.

Le sujet doit être informé de l'importance du recueil de la totalité de l'éjaculat car une fraction n'est pas représentative de l'ensemble de l'éjaculat. Directement après l'éjaculation le sperme coagulé se liquéfie progressivement à (20-25°C). Après liquéfaction le sperme est directement examiné.

4.6.1.2. Homogénéisation de l'éjaculat

L'homogénéisation doit être effectuée avant chacune des étapes de l'examen de l'échantillon. Il faut éviter de mélanger trop vigoureusement afin de ne pas créer des bulles. Le contenant est remué en décrivant des cercles avec le poignet pendant 15 à 20 secondes pour faire décoller le sperme des parois du contenant.

4.6.1.3. Examen macroscopique

4.6.1.3.1. Liquéfaction

Dès sa réception, l'échantillon de sperme est placé à la température de la pièce (20-25°C) pendant 30 min à 60min pour assurer sa liquéfaction. Au terme de celle-ci, l'examen est réalisé. Une liquéfaction prolongée doit être notée si l'éjaculat ne se liquéfie pas après ce délai.

4.6.1.3.2. Aspect

L'échantillon liquéfié est normalement d'aspect laiteux. Il peut être plus translucide s'il contient peu de spermatozoïdes. Si l'échantillon contient des érythrocytes, il peut être de couleur rouge brunâtre. Il peut également avoir une coloration plus jaunâtre si le patient souffre d'ictère ou prend certains suppléments de vitamines ou médicaments.

4.6.1.3.3. Odeur

On utilise notre propre odorat pour déterminer ce paramètre. A l'état normal le sperme a une légère odeur de chlore, alors qu'en cas d'infection l'odeur du sperme peut devenir désagréable.

4.6.1.3.4. Viscosité

La viscosité devrait être examinée après liquéfaction spontanée de l'éjaculat. Elle est appréciée en plongeant une pipette pasteur dans le sperme et en notant la façon dont le sperme s'écoule. Elle est considérée élevée lorsque le sperme forme des filaments de plus de 2 cm entre chaque goutte.

4.6.1.3.5. Volume

Le volume est mesuré en pesant le contenant après avoir calibré la machine. Le volume normal est compris entre 1,5 ml et 6 ml. En deçà de 1,5 ml on note une hypospermie et au-delà de 6ml on parle d'hyperspermie.

4.6.1.3.6. pH

Une goutte de sperme est déposée sur une bandelette de papier pH, la couleur de la zone imprégnée est comparée à une échelle de lecture. Le pH est mesuré dans l'heure qui suit l'éjaculation, les valeurs normales sont comprises entre 7,2 et 8.

4.6.1.4. Examen microscopique

L'analyse microscopique a été réalisée grâce à un équipement de laboratoire (logiciel et matériel), nommé le SCA SCOPE (MICROPTIC SL, Barcelone, Espagne). La préparation des échantillons se fait en fonction des paramètres à évaluer. Il est doté d'un microscope biologique de type Nikon Ci-L composé de plusieurs objectifs spécifiques de chaque analyse et d'une caméra de type Basler Ace

capable de prendre 200 images par seconde. Il est également muni d'un logiciel capable d'analyser les images.

4.6.1.4.1. Mobilité et concentration

Nous avons utilisé les lames de comptages jetables de la même compagnie MICROPTIC S.L qui permettent une analyse simultanée de la mobilité, de la concentration et du pH du sperme.

Dans un premier temps l'échantillon est bien homogénéisé, puis 5 à 10 µl de sperme sont déposés dans une chambre en prenant le soin d'éviter la formation des bulles. Ensuite la lame est placée sur la platine du SCA SCOPE et l'analyse est aussitôt lancée. Le mouvement de chaque spermatozoïde détecté est analysé puis classé selon les 3 catégories de mouvement. La motilité est exprimée en pourcentage. Les catégories de mouvement sont les suivantes :

A. Motilité progressive (PR)

Les spermatozoïdes se déplacent (en ligne droite, en zigzag ou en formant de grands cercles) peu importe leur vitesse.

B. Motilité non progressive (NP)

Les spermatozoïdes qui bougent, mais dont les mouvements ne permettent pas le déplacement (petits cercles, faibles battements déplaçant à peine la tête, battements de flagelle seulement).

C. Immobiles (IM)

Les valeurs de référence pour la motilité : mobilité totale (PR+NP) \geq 40 %, motilité progressive (PR) \geq 32 %. Ces valeurs correspondent au 5 e percentile établi dans la cinquième édition du manuel de l'OMS (52). On parle d'asthénozoospermie

lorsque le pourcentage de la motilité des spermatozoïdes est inférieur aux valeurs de référence.

Les valeurs de référence pour la concentration : la concentration désigne le nombre de spermatozoïdes, exprimé en millions, dans un millilitre d'éjaculat. La valeur absolue désigne le nombre de spermatozoïdes dans l'échantillon complet. La valeur de référence quant à la concentration de spermatozoïdes est égale ou supérieure à 15×10^6 /ml (correspond au 5e percentile établi dans la cinquième édition du manuel de l'OMS). On parle d'oligozoospermie lorsque la concentration des spermatozoïdes est en sous la limite inférieure de la référence. Dans le cas de la valeur absolue, la valeur de référence est égale ou supérieure à 39×10^6 /éjaculat (correspond au 5e percentile établi dans la cinquième édition du manuel de l'OMS) (52).

4.6.1.4.2. Cellules rondes

À l'examen de la mobilité le SCA SCOPE peut également observer les cellules rondes et les calculer. La concentration normale en cellules rondes d'un éjaculat ne doit pas excéder 10^6 cellules/ml.

4.6.1.4.3. Vitalité

La vitalité correspond au pourcentage des spermatozoïdes vivants dans l'échantillon. Ce paramètre est évalué après coloration du sperme par un colorant appelé BrighVit (coloration à base d'eosine-nigrosine) optimisé dans une technique de coloration en une étape.

Préparation du frottis : Dans $40 \mu\text{l}$ de BrighVit au préalable traité à 37°C dans un bain marie, est ajouté $10 \mu\text{l}$ d'échantillon. Incubée pendant 5 à 10min à 37°C , la mixture est homogénéisée et $20 \mu\text{l}$ de cette mixture est mesuré sur la lame (vitalité SCA). Une seconde lame est déposée sur la première sans presser et sont séparés par un mouvement horizontal. On laisse les lames sécher à l'air libre.

La lecture des lames se fait sous microscope au grossissement 100x à immersion, ainsi les spermatozoïdes morts deviennent roses ou rouges quand on les colorent à l'éosine-nigrosine, tandis que les spermatozoïdes vivants ne prennent pas le colorant et reste blanc. Cent spermatozoïdes sont comptés par échantillon et le pourcentage des spermatozoïdes morts ainsi que celui des spermatozoïdes vivants sont déterminés. La vitalité est considérée normale si le pourcentage des spermatozoïdes vivants est supérieur ou égal à 58 %. En dessous de cette valeur on parle de nécrozoospermie (52).

Nous avons évalué la vitalité au microscope car le SCA SCOPE rencontrait des difficultés à bien lire les lames.

Dans son manuel, l'OMS propose d'évaluer la vitalité lorsque la motilité des spermatozoïdes progressifs est inférieure à 40% (52).

4.6.2. Spermocytogramme

Un spermocytogramme est un examen médical correspondant à l'analyse cytologique et morphologique des spermatozoïdes. Pour réaliser cet examen nous avons procédé comme suit. Dans un premier temps une quantité de l'échantillon est lavé avec du PBS puis dilué de sorte à avoir 50 millions de spermatozoïdes par ml. Les échantillons avec une concentration inférieure à 15 millions de spermatozoïdes n'ont pas été dilués. Dans un deuxième temps, 10 µl d'échantillon dilué est déposé sur la lame colorée et le frottis est effectué. On attend 20 à 30 secondes et on plonge deux fois la lame dans l'eau distillée et on la laisse sécher à l'air libre.

Une fois que la lame est sèche on ajoute dessus 2 gouttes d'EUKITT (colle de montage de la société MICROPTIC S.L, sans xylène) utilisée dans l'analyse des échantillons de morphologie. Elle permet d'obtenir une image contrastée ce qui facilite la mise au point de l'échantillon tout en améliorant la qualité de l'analyse) et

on dépose une lamelle dessus, on laisse sécher pendant 15 minutes. On place alors la lame sur la platine du SCA SCOPE pour l'analyse de la morphologie. Cent spermatozoïdes sont analysés et classés selon qu'ils sont normaux ou anormaux.

Les anomalies sont répertoriées en quatre classes selon la classification de Kruger Tête, Pièce intermédiaire, flagelle, reste cytoplasmique. Une seule anomalie dans une de ces quatre classes suffit à classer le spermatozoïde comme atypique. Au moins 4% des spermatozoïdes doivent avoir une forme typique pour que le spermocytogramme soit considéré comme normal. En deçà de cette valeur on parle de tératozoospermie.

Le SCA a la particularité d'évaluer d'autres paramètres tels que l'index de tératozoospermie, l'index d'anomalies multiples, et l'index de déformation.

4.6.3. Technique de fragmentation

L'étude de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes a été réalisée à l'aide du test de dispersion de la chromatine (SCD) et les résultats ont été exprimés en %DFI.

La technique SCD a été effectuée avec le kit GoldCyto DNA de la compagnie MICROPTIC S.L (Barcelone, Espagne). Le kit est composé de lames prétraitées, des tubes Eppendorf contenant de l'agarose, une solution tampon de phosphate saline (PBS), une solution des agents dénaturants, une solution de lyse, une solution de colorant TA et une solution de colorant TB.

Protocole :

Nous avons suivi le protocole suivant pour réaliser la technique SCD (Sperm Chromatin Dispersion) selon celui décrit par la procédure du kit.

- a) Laver le sperme frais. Deux lavages sont faits en ajoutant la solution de PBS qui doit être le double du volume de l'échantillon

-
- b) Centrifuger pendant 10 min à 15000 tours/min, ensuite enlever le surnageant et conserver le culot.
 - c) Diluer ou concentrer l'échantillon dans le PBS pour obtenir une concentration moyenne de 10 millions de cellules par ml
 - d) Faire fondre l'agarose gélifié contenu dans des tubes Eppendorf en le plaçant dans un four à 90°C pendant 5 minutes.
 - e) Placer le tube Eppendorf dans un bain marie à 37°C pendant 5 minutes pour rééquilibrer la température.
 - f) Placer un plateau en métal, en verre ou plastique à 4°C.
 - g) Ajouter 30 µl du sperme dilué dans le tube contenant l'agarose et mélanger soigneusement pour éviter la formation de bulles.
 - h) Déposer 14 à 20 µl du mélange sur une lame prétraitée et recouvrir d'une lamelle.
 - i) Déposer la lame sur la plaque froide et placer à 4°C pendant 5 minutes afin que le mélange se solidifie.
 - j) Retirer délicatement la lamelle et immerger immédiatement la lame horizontalement dans la solution de dénaturation pendant 7 minutes à température ambiante.
 - k) Immerger la lame dans la solution de lyse et laisser incuber pendant 25 minutes à température ambiante (20-25°C).
 - l) Rincer la lame en l'incubant dans l'eau distillée pendant 5 minutes.
 - m) Déshydrater la lame dans des bains successifs d'alcool de 70%, 90%, 100% pendant 2 minutes pour chaque bain.
 - n) Egoutter la lame en l'inclinant et la laisser sécher à l'air libre.

-
- o) Placer la lame sur un flotteur dans une boîte de pétri. À l'aide d'une pipette pasteur appliquer 0.5ml-0.8ml de la solution TA sur la surface d'agarose, laisser agir pendant 1 minute.
 - p) Ajouter la solution TB sur la solution TA, (2 à 3 fois le volume de TA). Souffler doucement avec la bouche afin de mélanger les deux solutions et laisser agir pendant 3 à 10 minutes.
 - q) Laver les lames à l'eau du robinet et laisser sécher à température ambiante(20-25°C).

La lecture s'effectue dans la partie Hardware du SCA SCOPE, au moins 300 spermatozoïdes sont analysés et comptés et les pourcentages des spermatozoïdes fragmentés et non fragmentés sont calculés. En l'absence de dommages dans l'ADN, de grands halos apparaissent autour de la tête du spermatozoïde. Les spermatozoïdes avec ADN fragmentés ne présentent aucune dispersion de chromatine (halos petits ou absents).

4.6.4. Analyses statistiques

L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel SPSS statistics 27.0 (IBM, USA) et Excel (Microsoft, USA). Nous avons utilisé le test de corrélation de Spearman pour les analyses statistiques. Ainsi, le test est considéré comme statistiquement significatif lorsque la valeur de $p < 0.05$.

RESULTATS

5. RESULTATS

Les patients que nous avons inclus dans cette étude sont des hommes référés au laboratoire ALGI pour infertilité ou hypofertilité du couple. Nous avons analysé les données de 51 individus inclus dans cette étude.

5.1. Données cliniques

5.1.1 Âge

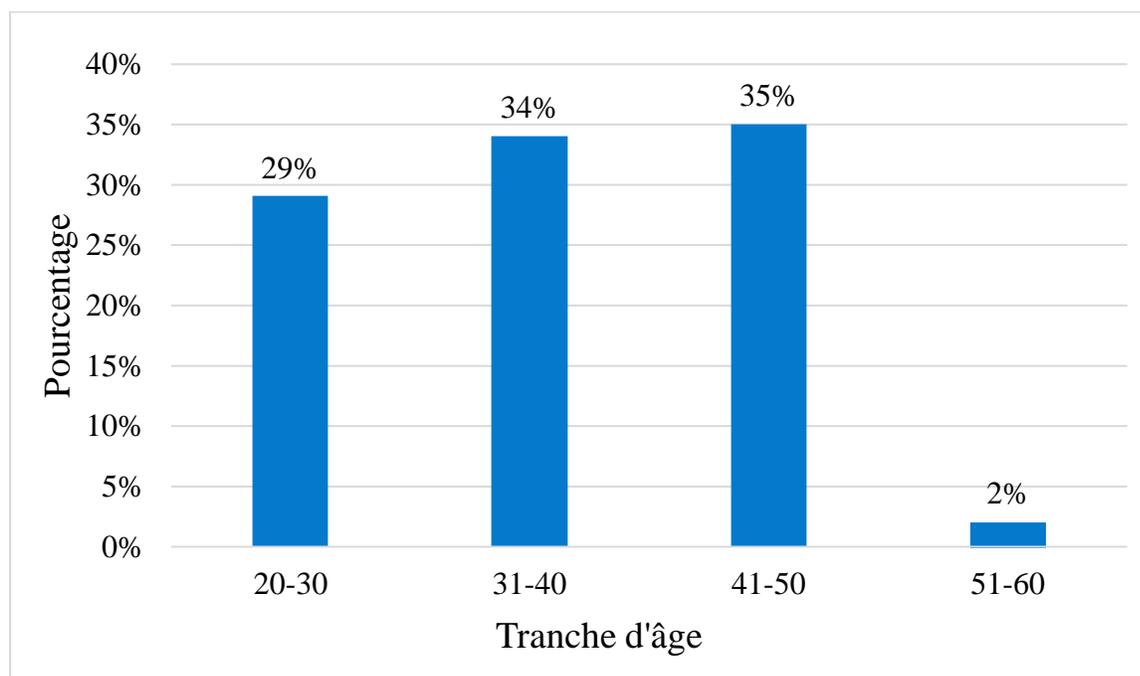


Figure 5: Répartition des individus en fonction de l'âge

L'âge moyen des participants était de 37 ans avec des extrêmes de 20 ans et 52 ans. Les tranches d'âge les plus représentées sont de 41-50 ans (35%) et 31-40 ans (34%).

5.1.2. Indications cliniques

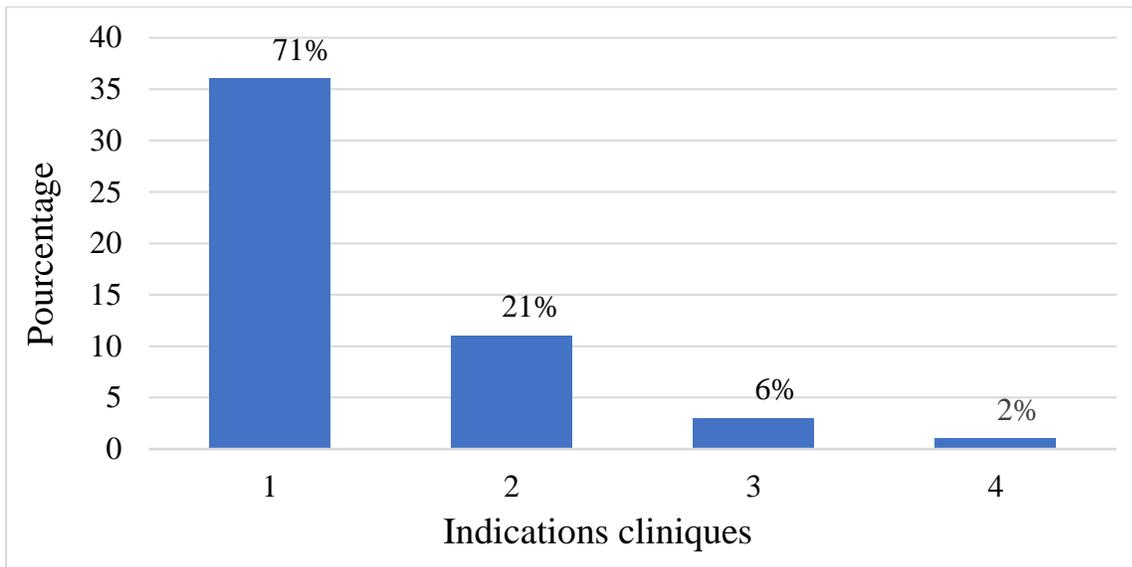


Figure 6: Répartition des individus en fonction de l'indication clinique

Parmi les 51 Individus recrutés au cours de l'étude, 36 soit 71% ont été admis pour un bilan de fertilité primaire.

5.1.3. Lieu de prélèvement

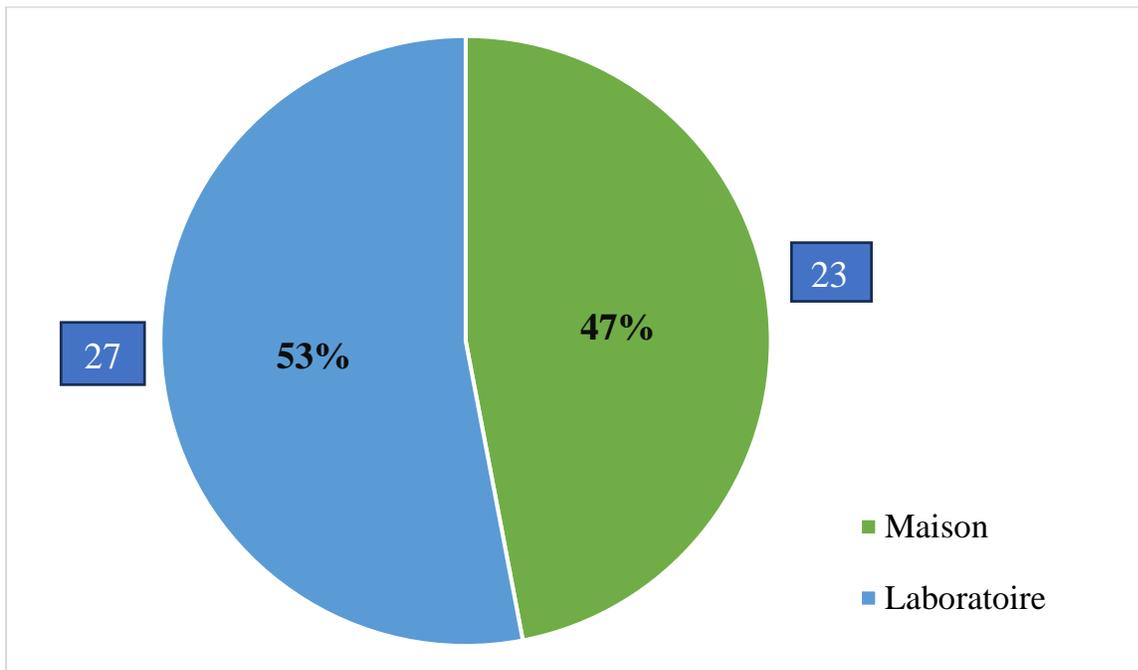


Figure 7: Répartition des individus en fonction du lieu de prélèvement

Plus de la majorité des individus (27 sur 51) ont effectué leurs prélèvements au laboratoire.

5.1.4. Durée d'abstinence

Tableau I: Répartition des individus en fonction de la durée d'abstinence

Durée d'abstinence (jours)	Effectif	Pourcentage
3	26	51
4-10	24	47
10-15	1	2
Total	51	100

Nous avons trouvé que 51% des Individus avaient observé une abstinence d'une durée de 3 jours.

5.2. Données du spermogramme

5.2.1. Volume du sperme

Tableau II: Répartition des individus en fonction du volume du sperme

Volume	Effectifs	Pourcentage
<1,5 ml	3	6
1,5-6 ml	46	90
> 6 ml	2	4
Total	51	100

Quarante-six Individus soit 90% avaient un volume normal de sperme c'est-à-dire compris entre 1,5mL et 6mL.

5.2.2. Concentration des spermatozoïdes

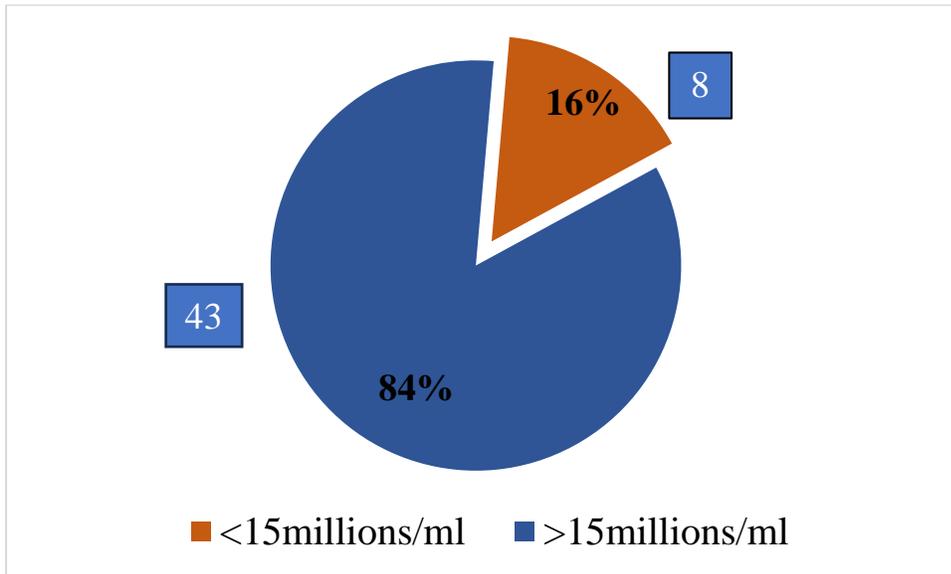


Figure 8: Répartition des individus selon la numération des spermatozoïdes

Nous avons observé chez 16% des individus une concentration de spermatozoïdes inférieure à la valeur normale (<15 millions/ ml).

5.2.3. Mobilité

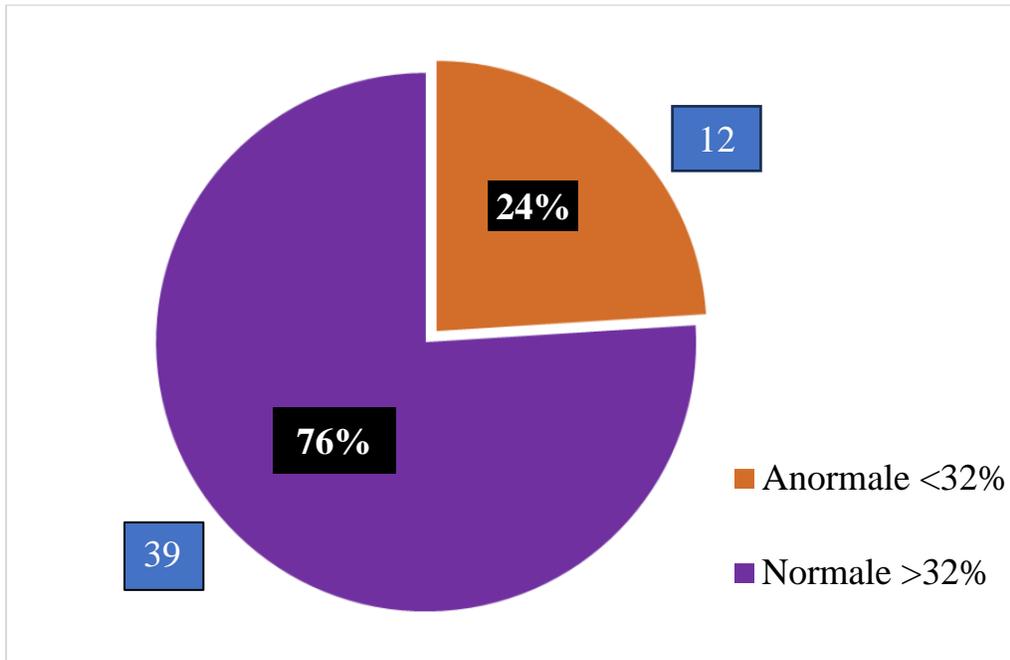


Figure 9: Répartition des individus en fonction de la mobilité

Au courant de notre étude, la grande majorité des participants (76%) avaient au moins 32% de spermatozoïdes à mobilité progressive.

5.2.4. Cellules rondes

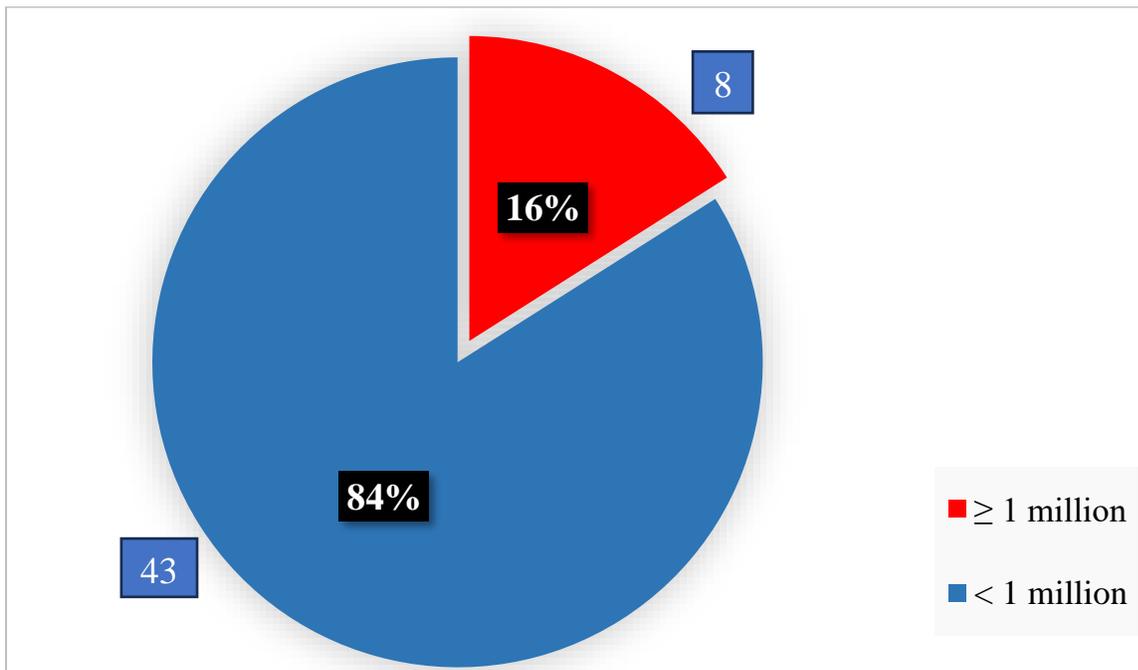


Figure 10: Répartition des individus en fonction de la concentration des cellules rondes

L'évaluation des cellules rondes nous a permis de déterminer chez 8 (16%) individus une fréquence plus élevée de ces cellules.

5.2.5. Vitalité

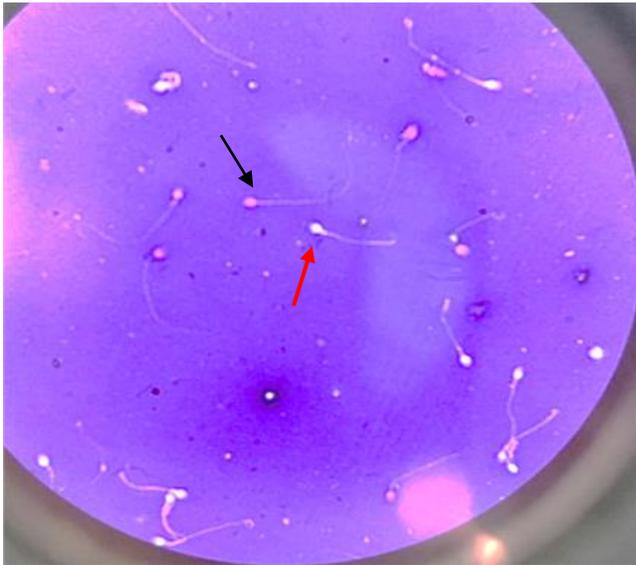


Figure 11: Image de spermatozoïdes

Les spermatozoïdes vivants n'ont aucune coloration et un d'entre eux est indiqué par la flèche rouge. Par contre, les spermatozoïdes non viables sont colorés en rouge et un d'entre eux est indiqué par la flèche noire

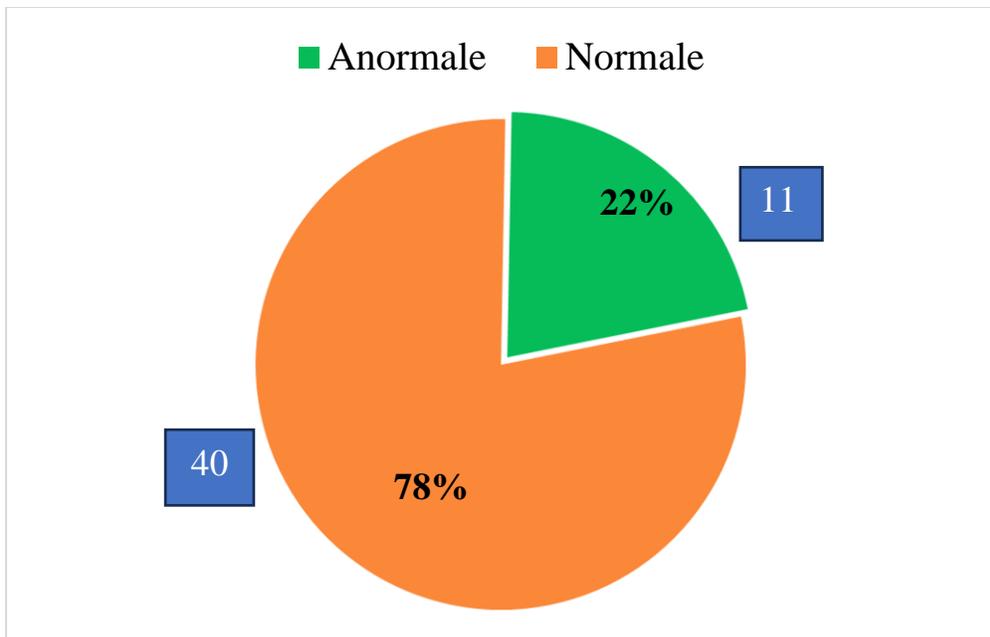


Figure 12: Répartition des individus en fonction de la vitalité

Dans notre cas nous avons trouvé que 78% (40 sur 51) des participants avaient une vitalité normale.

5.2.6. Morphologie

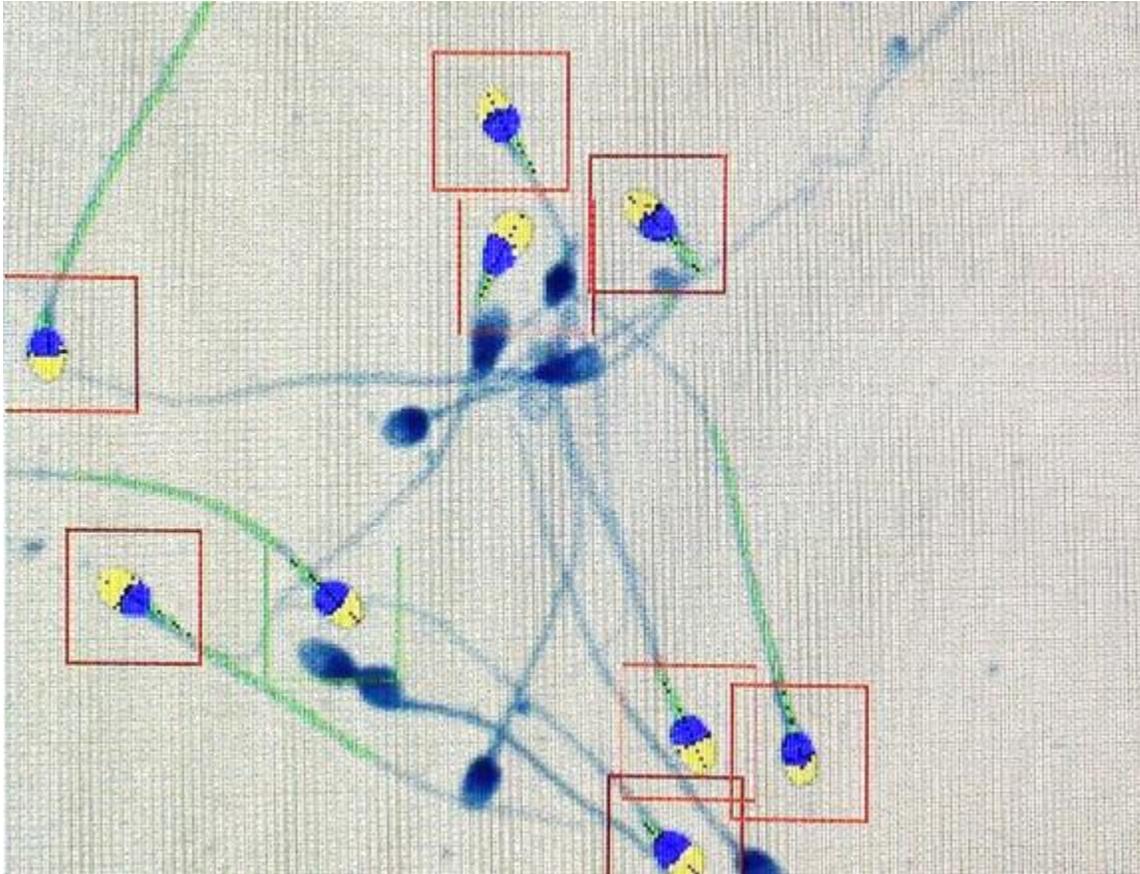


Figure 13: Morphologie des spermatozoïdes.

L'analyse de la morphologie des spermatozoïdes a été effectuée par le SCA SCOPE. Comme nous pouvons le constater sur l'image ci-dessus, le SCA a la capacité d'analyser les spermatozoïdes afin de déceler les différentes anomalies morphologiques.

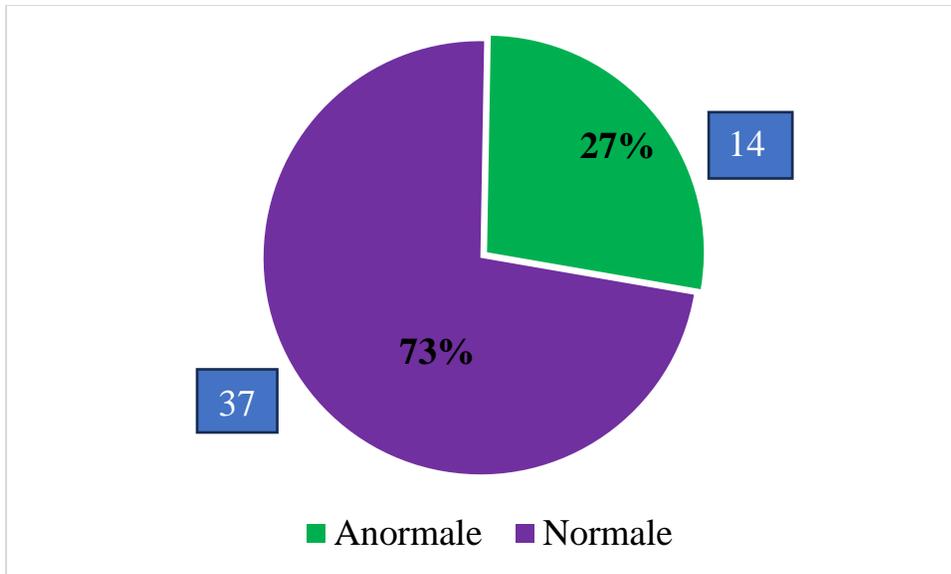


Figure 14: Répartition des individus en fonction de la morphologie

Au courant de notre étude nous avons que 73% (37 sur 51) des participants avaient une morphologie normale.

5.2.7. Anomalies du Spermogramme

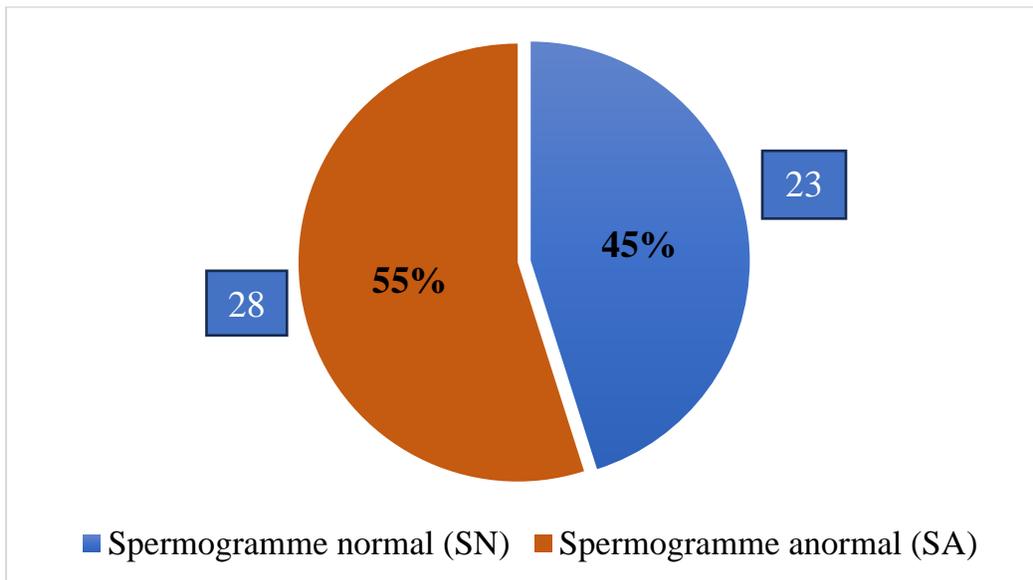


Figure 15: Répartition des individus en fonction du résultat du spermogramme.

En considérant les paramètres analysés du spermogramme, nous avons trouvé que 23(45%) individus de la population d'étude présentaient un spermogramme anormal.

Tableau III: Répartition des individus en fonction des anomalies du spermogramme

Anomalies spermogramme	Effectifs	Pourcentage
Spermogramme normal	23	45
Tératozoospermie isolée	7	13
Asthénozoospermie isolée	4	8
Asthéno-nécrozoospermie	2	4
Nécrozoospermie isolée	2	4
Oligo-asthéo-tératozoospermie	2	4
Oligo-asthéo-nécrozoospermie	1	2
Oligozoospermie isolée	2	4
Oligo-nécrozoospermie	2	4
Asthéno-tératozoospermie	2	4
Oligo-tératozoospermie	2	4
Oligo-terato-necrozoospermie	2	4
TOTAL	51	100

Parmi les 51 patients représentant la population d'étude, 23 (45%) avaient un spermogramme normal et les 28 (55%) autres présentaient un spermogramme anormal. Au sein de groupe des spermogrammes anormaux, on a observé en majorité une tératozoospermie isolée avec une fréquence de 25% (7 cas sur 23).

5.3. Données sur la fragmentation de l'ADN

5.3.1. Indice de fragmentation

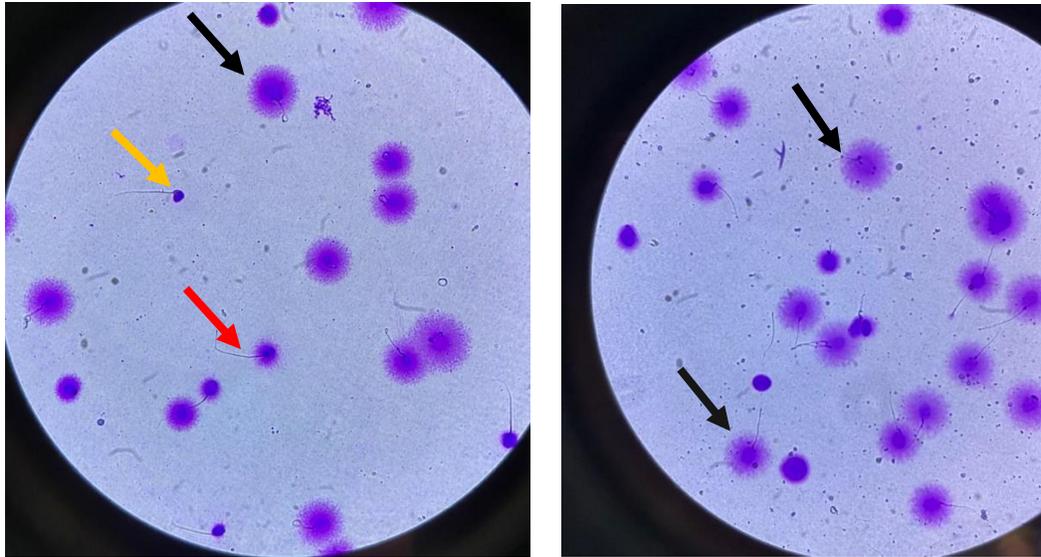


Figure 16: Fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

Ces images représentent les spermatozoïdes avec divers degrés de fragmentation de l'ADN par le test SCD. Les flèches noires indiquent les spermatozoïdes avec un ADN intact, ils forment donc de grands halos. Les flèches rouge et jaune indiquent les spermatozoïdes avec ADN fragmentés ils forment soit un petit halo, soit pas de halos.

Tableau IV: Répartition des individus selon l'indice de fragmentation de l'ADN (DFI)

Indice de Fragmentation ADN (%)	Effectif	Pourcentage
Fragmentation faible (0-15)	18	35
Fragmentation modérée (15-30)	18	35
Fragmentation élevé (> 30)	15	30
Total	51	100

L'indice de fragmentation d'ADN (DFI) défini par la SCD est le pourcentage de spermatozoïde fragmentés par rapport au nombre total de spermatozoïdes lus.

Au sein de notre population d'étude, 33 (65 %) des 51 individus avaient un DFI supérieur à la valeur seuil, et parmi ces 33 individus 15 présentaient un DFI supérieur à 30%, en d'autres termes élevé.

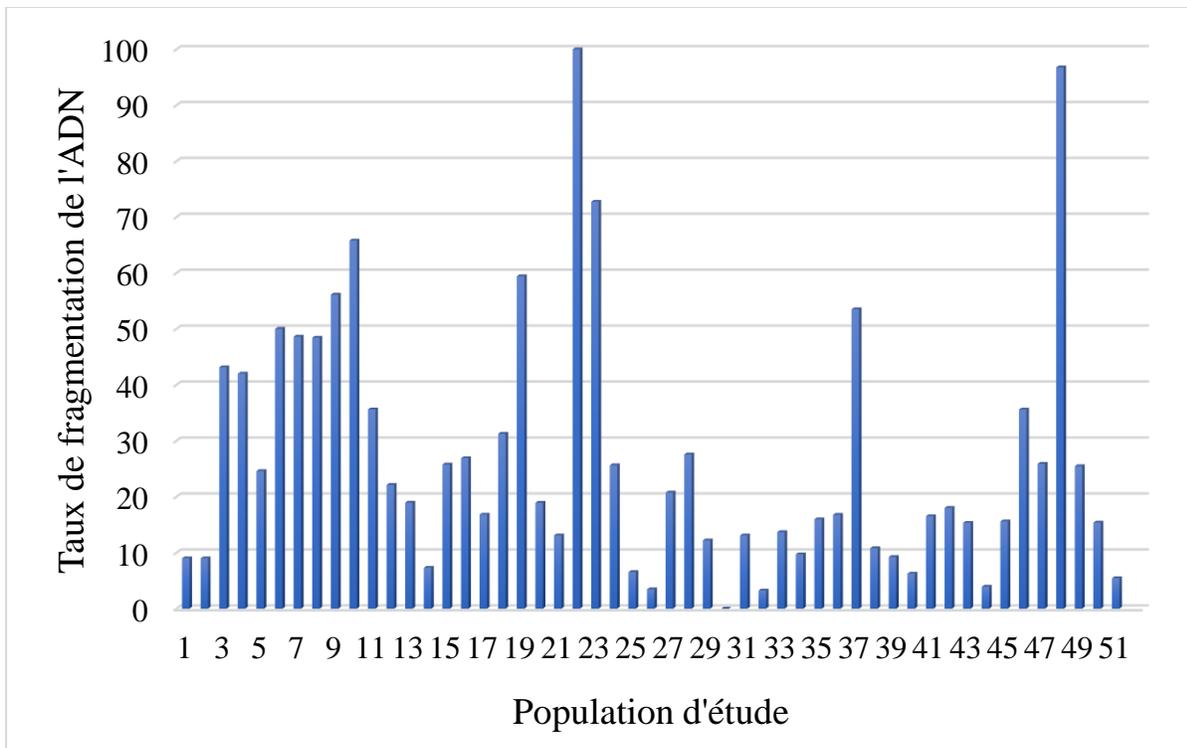


Figure 17: Distribution des valeurs de la fragmentation de l'ADN après le test de dispersion de la chromatine de la population d'étude.

Le taux moyen des spermatozoïdes à ADN fragmenté évalué par le test de dispersion de la chromatine dans la population d'étude était de 26,80% avec des extrêmes de 0% et 100%. Le taux de fragmentation le plus élevé était de 100% était observé chez le patient 22 et le taux le plus faible était de 0% chez le patient 30.

5.3.2. Fragmentation et spermogrammes normaux

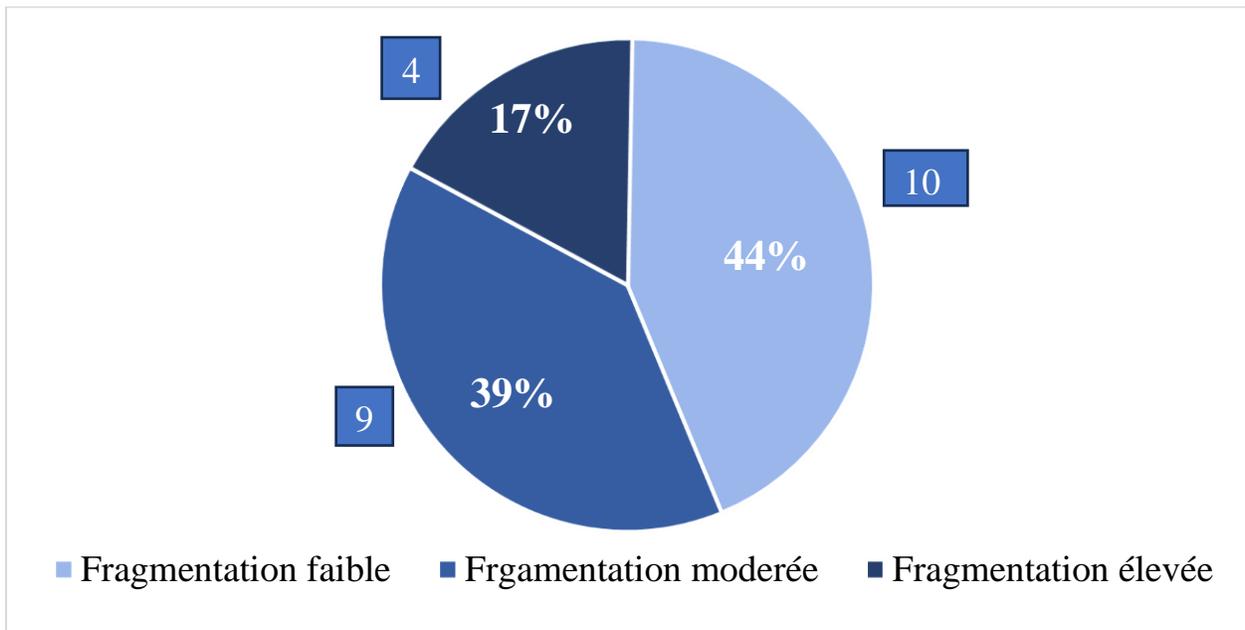


Figure 18: Distribution du taux de fragmentation d'ADN chez les individus présentant un spermogramme normal.

Parmi les 23 individus avec un spermogramme normal, 17% (4/23) et 39% (9/23) d'entre eux présentaient un DFI modéré (15-30) et élevé (> 30 %), respectivement.

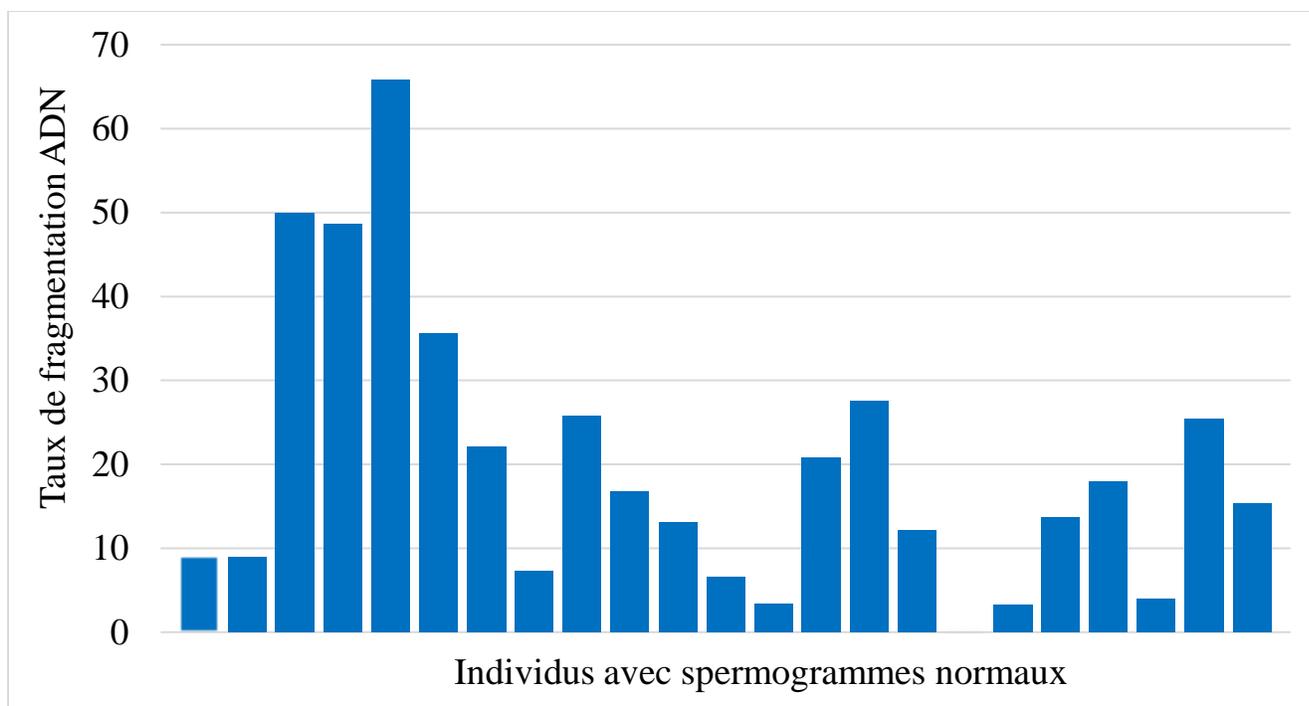


Figure 19: Distribution des valeurs de la fragmentation d'ADN des individus avec spermogrammes normaux.

La valeur moyenne de DFI était de 19.70% avec des extrêmes entre 0% et 65.79%. En outre, 4 individus présentaient un DFI supérieur à 30%.

5.3.3. Fragmentation et spermogrammes anormaux

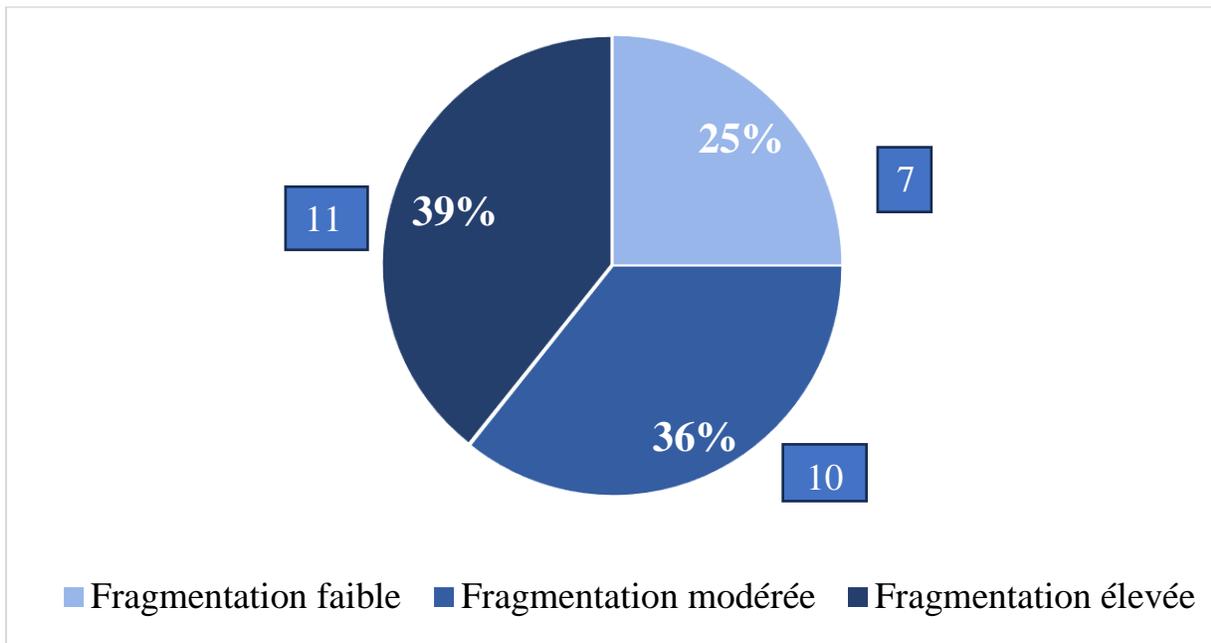


Figure 20: Distribution du taux de fragmentation d'ADN chez les individus présentant un spermogramme anormal.

Parmi 28 individus qui présentaient un spermogramme anormal, nous avons trouvé que 11 d'entre eux avaient un DFI supérieur à 30%.

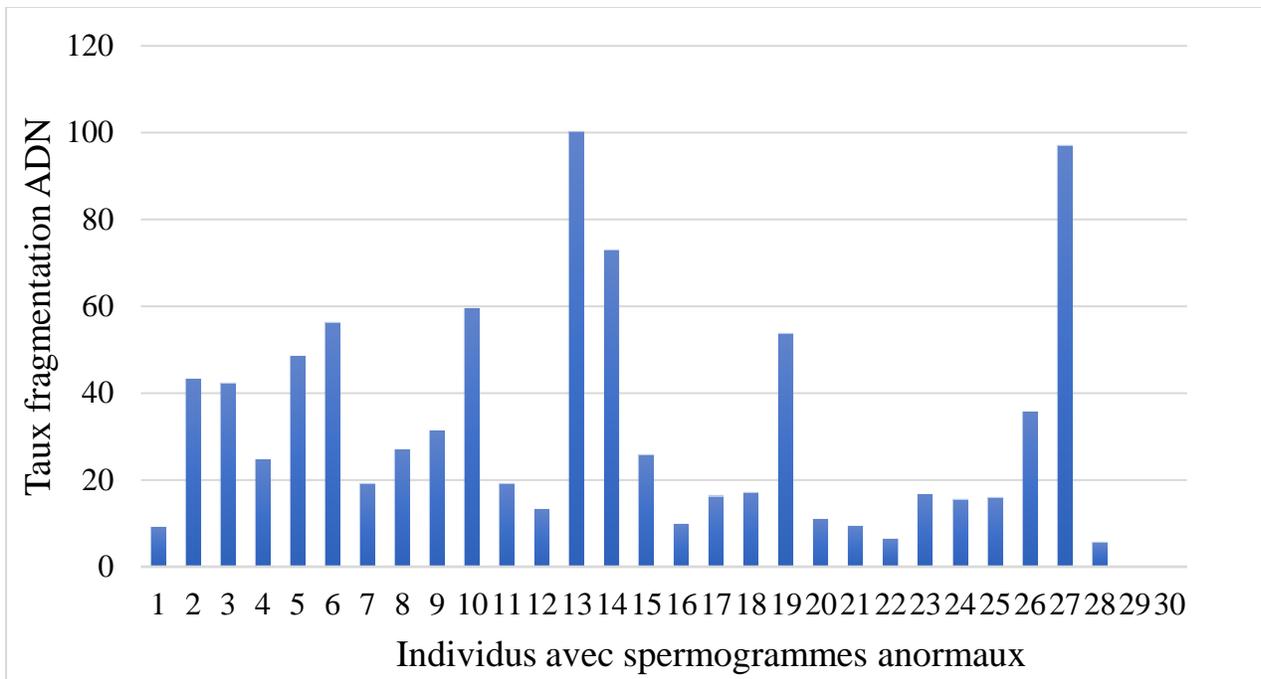


Figure 21: Distribution du DFI chez les individus avec un spermogramme anormal.

Le taux de gamètes avec ADN fragmentés dans le groupe des patients avec spermogrammes anormaux varie entre 5,45% et 100% avec une valeur moyenne de 32,05%.

5.4. Corrélation entre paramètres du spermogramme et DFI

5.4.1. Vitalité et DFI

Tableau V: Corrélation entre la vitalité et le taux de fragmentation

Vitalité	DFI			Total
	Faible <15%	Modéré 15-30%	Élevé >30%	
Normale	18	16	6	40
Anormale	0	2	9	11

Comme précédemment mentionné, nous avons établi la vitalité selon les critères de l’OMS qui définit une vitalité normale lorsque le pourcentage des spermatozoïdes viables est supérieur ou égale à 58% et anormale quand ce pourcentage est inférieur à 58% (51). Nous avons trouvé que les individus présentant une vitalité anormale avaient tous des spermatozoïdes ayant un DFI moyen ou élevé (11/11). Par contre, une vitalité normale n’excluait pas une élévation du DFI car plus de la moitié des individus (22/40) ayant une vitalité normale des spermatozoïdes présentaient DFI modéré ou élevé. L’analyse statistique a montré une corrélation significative entre une élévation de la fragmentation et la proportion de spermatozoïdes non viables ($r = -0,583$; $p < 0,000001$). La vitalité des spermatozoïdes est inversement associée au DFI.

5.4.2. Mobilité et fragmentation

Tableau VI: Corrélation entre la valeur de motilité et le taux de fragmentation

Mobilité	DFI			Total
	Faible <15%	Modéré 15-30%	Élevé >30%	
Normale	14	15	10	39
Anormale	2	4	6	12

Comme nous l'avons ultérieurement évoqué, nous avons établi la mobilité selon les critères de l'OMS qui définit qu'un sperme normal doit contenir au moins 32% de spermatozoïdes à mobilité progressive (51). Nous avons trouvé que parmi les individus qui présentaient une mobilité anormale, la grande majorité avait un DFI moyen ou élevé (10/12). En revanche, une mobilité normale n'excluait pas une élévation du DFI car plus de la moitié des individus (25/39) ayant une mobilité normale des spermatozoïdes présentaient DFI modéré ou élevé. L'analyse statistique a montré une corrélation significative entre une élévation de la fragmentation et une faible mobilité progressive ($r = -0,334$; $p = 0,016$). La mobilité des spermatozoïdes est inversement associée au DFI.

5.4.3. Concentration et Fragmentation

Tableau VII: Corrélation entre la concentration et le taux de fragmentation

Concentration	DFI			Total
	Faible <15%	Modéré 15-30%	Élevé >30%	
Normale	15	15	13	43
Anormale	1	5	2	8

Nous nous sommes basés sur les valeurs de l’OMS pour mesurer la concentration des spermatozoïdes. Selon l’OMS, la valeur normale de la concentration des spermatozoïdes est de 15 millions pour chaque millilitre d’éjaculat (51). Nous avons remarqué que sur les 8 les individus qui présentaient une concentration anormale de spermatozoïdes, un seul avait un DFI normal (1/8). Cependant une concentration normale n’était synonyme de DFI faible car 28 individus sur les 43 qui présentaient une concentration normale avaient un DFI modéré ou élevé. L’analyse statistique a montré une corrélation significative entre une élévation de la fragmentation et la faible concentration de spermatozoïdes ($r = -0,302$; $p = 0,031$). La concentration des spermatozoïdes est inversement associée au DFI.

5.4.4. Morphologie et Fragmentation

Tableau VIII: Corrélation entre la morphologie et le taux de fragmentation

Morphologie	DFI			Total
	Faible <15%	Modéré 15-30%	Élevé >30%	
Normale	12	13	12	39
Anormale	3	7	4	14

Nous nous sommes rapportés aux valeurs de l’OMS pour mesurer la morphologie des spermatozoïdes. Selon l’OMS un sperme normal doit contenir au moins 4% de spermatozoïdes normaux (typiques) (51). Nous avons trouvé que sur les 14 individus qui présentaient un pourcentage de morphologie anormal trois (3) avaient un DFI faible. Cependant, une morphologie normale n’était pas synonyme de DFI faible car 25 individus sur les 39 qui présentaient une morphologie normale avaient un DFI modéré ou élevé. L’analyse statistique n’a pas montré de corrélation significative entre une élévation de la fragmentation et une morphologie anormale ($r = -0,115$ $p = 0,421$).

5.4.5. Spermogramme et Fragmentation

Tableau IX: Corrélation entre le résultat du spermogramme et le taux de fragmentation

Spermogramme	DFI			Total
	Faible <15%	Modéré 15-30%	Élevé >30%	
Normale	10	9	4	23
Anormale	7	10	11	28

Nous avons trouvé que sur les 23 individus qui présentaient un spermogramme normal 13 avaient un taux de fragmentation anormal. Tandis que parmi les 28 individus qui avaient un spermogramme anormal 21 avaient un taux de fragmentation anormal. Nous avons trouvé une corrélation significative entre un spermogramme anormal et un taux élevé de fragmentation ($p=0,001$).

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

L'objectif de cette étude était de démontrer la faisabilité et l'intérêt de l'utilisation de la technique de fragmentation Sperm Chromatin Dispersion (SCD) comme technique complémentaire aux analyses de spermogramme et de spermocytogramme afin de permettre une meilleure appréciation de la qualité des gamètes mâles même lorsque ces analyses semblent normales.

Nous avons recruté 51 individus référés pour évaluation du spermogramme et du spermocytogramme. En outre d'évaluer les paramètres du spermogramme et du spermocytogramme. Nous avons également étudié la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes par le test de dispersion de la chromatine (SCD). À notre connaissance c'est la première fois qu'une étude pareille est menée au Mali. Cette technique d'évaluation de la qualité de l'ADN des spermatozoïdes est une étape importante dans la détermination de nouvelles stratégies de prise en charge de l'infertilité masculine.

Par ailleurs, nous avons des limites sur l'étude, notamment une petite taille de notre population d'étude, une courte durée de notre essai et aussi nous n'avons pas pu faire le recrutement d'individus témoins.

Au cours de notre étude, les données cliniques que nous avons analysées étaient les indications cliniques et l'âge. Soixante-onze pourcent des individus avaient consulté pour un bilan d'infertilité primaire. L'âge moyen était de 37 ans avec des extrêmes allant de 20 ans à 52 ans. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par A. Kbirou (53) et O. Bagayoko (54) qui ont retrouvé, respectivement, un âge moyen de 37,5 ans et de 35 ans. Une étude faite en Turquie a retrouvé la même tendance d'âge moyen lors de l'analyse du spermogramme pour cause d'infertilité masculine et cet âge était de 37.18 ± 8.11 ans (55). Nous pouvons

présumer que cette tranche d'âge serait liée au fait que les hommes, au Mali, en milieu urbain se marient entre 30 et 40 ans. Nous pouvons aussi croire que cette tranche d'âge pourrait être liée au fait que si après quelques années un couple n'a pas d'enfant, la femme est la première à faire des investigations car pour la plupart la virilité est synonyme de fertilité. De plus nous pouvons aussi supposer qu'elle serait liée au fait que beaucoup de couples ont recours à la médecine traditionnelle avant de consulter un médecin spécialiste.

En ce qui concerne le spermogramme, nous avons mis l'accent sur cinq paramètres notamment : le volume, la vitalité, la concentration, la mobilité et la morphologie.

Au cours de notre étude 90% des individus avaient un volume normal compris entre 1,5 ml et 6 ml. Cependant, 6% des individus avaient un volume inférieur à la norme (hypospermie) contre 4% qui présentaient une hyperspermie. Ces valeurs sont proches de celles rapportées par Batou S. A. (56) qui a trouvé un volume moyen de 3,9 ml. Elles se rapprochent aussi de celles rapportées par Sangaré S.L (57) qui retrouva que 90% des individus avaient un volume normal et 10% présentaient une hypospermie. Les valeurs du volume inférieures à la norme pourraient s'expliquer par une abstinence trop courte, un recueil incomplet de l'échantillon, un dysfonctionnement de la prostate ou des vésicules séminales ou une éjaculation rétrograde. À l'inverse, les valeurs du volume supérieure à la norme pourraient se traduire par une abstinence trop prolongée.

Pour ce qui est de la concentration des spermatozoïdes, nous avons trouvé que 84% des individus avaient une concentration spermatique normale (supérieure à 15 millions par ml de sperme). En revanche, 16% des individus avaient une concentration spermatique inférieure à la norme. Ces résultats sont différents à ceux

rapportés par d'autres auteurs qui ont mentionné des valeurs qui oscillaient entre 48% à 58,5% (58-61). La différence entre leurs données et les nôtres s'explique par le biais de sélection qui était inhérente à notre étude. En effet, nous avons exclus des azoospermies de notre étude car l'évaluation de la fragmentation de l'ADN n'est pas faisable chez eux.

Quant à la mobilité, nous avons trouvé que 76% des individus avaient une mobilité progressive normale c'est-à-dire supérieure à 32%. En outre, notre étude avait aussi la particularité de montrer un pourcentage (78%) plus élevé d'individus ayant des spermatozoïdes avec une vitalité normale. Par contre, d'autres études ont montré de faibles pourcentages d'individus présentant des spermatozoïdes avec une mobilité et une vitalité normale (62-64). Encore, cette différence entre ces études et la nôtre est due principalement au biais de sélection des individus ne présentant pas d'azoospermie. Enfin, nous avons trouvé que 27% des individus présentaient une tératozoospermie. Contrairement à la mobilité et la vitalité, nos résultats sur la morphologie des spermatozoïdes étaient assimilables à ceux retrouvés dans la littérature (64,65).

En considérant les paramètres du spermogramme sus mentionnés, nous avons trouvé que 28 individus (55%) avaient un spermogramme anormal. Les principales anomalies retrouvées dans les spermogrammes anormaux étaient la tératozoospermie isolée (25%) et l'asthénozoospermie isolée (14%). Plusieurs études ont retrouvé une fréquence plus élevée (67, 67) de spermogramme anormal chez des individus référés pour infertilité que celle retrouvée dans la nôtre. Ce taux élevé de normozoospermie dans notre étude pourrait s'expliquer par le fait que nous avons principalement pris pour cible les individus n'ayant pas d'azoospermie, cryptozoospermie et oligo-asthénospermie sévère (OATS).

L'exploration de l'infertilité masculine en première intention repose sur l'analyse du spermogramme et du spermocytogramme. Ces examens permettent d'évaluer la fertilité masculine, mais ils ne procurent pas d'information sur l'intégrité du matériel génétique des spermatozoïdes contenus dans un échantillon de sperme. L'impact négatif de la fragmentation de l'ADN sur les capacités de fécondation des spermatozoïdes et le développement embryonnaire a été mis en évidence par plusieurs études (68-70). Des études ont montré que les spermatozoïdes présentant un ADN fragmenté sont plus fréquents chez les hommes infertiles que chez les hommes fertiles (50) et que l'ADN spermatique fragmenté peut conduire à la transmission paternelle de matériel génétique défectueux, avec des conséquences néfastes sur le développement embryonnaire (71,72).

Notre étude a révélé que 33 (65%) individus avaient une fragmentation d'ADN anormale (modéré ou élevée). Chez les 23 individus ayant un spermogramme normal, 56% (39% modéré, 17% élevé) de ceux-ci présentaient une fragmentation d'ADN anormal. En revanche, nous avons trouvé que dans le groupe des individus avec un spermogramme anormal, 75% (21/28) de ces individus avaient une fragmentation anormale (36% élevée et 39% pathologique). Les résultats de notre étude indiquent que les niveaux de fragmentation de l'ADN défini par le test SCD dans le sperme des hommes présentant des paramètres anormaux était plus élevé que celui de ceux qui avaient des paramètres de sperme normaux. Les résultats de notre étude se rapprochent de ceux rapportés par Saleh R (16) qui indiquent que 43% des individus qui présentaient des paramètres de sperme normaux avaient un taux de fragmentation élevée, contre, 62% des individus qui présentaient des paramètres de sperme anormaux. Ainsi nous avons mis en évidence qu'un index de fragmentation spermatique modéré ou élevé peut être observé chez un individu même avec un spermogramme normal. Ces résultats ont une valeur diagnostique et

pronostique importante dans la prise en charge de l'infertilité masculine. Le taux élevé de spermatozoïdes avec de l'ADN fragmenté trouvé chez les hommes qui ont des paramètres normaux de spermogramme pourrait être une explication à leur infertilité.

L'étude corrélation entre l'index de fragmentation de l'ADN (DFI) et des paramètres du spermogramme a montré une corrélation négative significative statistiquement entre le DFI et la concentration ($p=0,049$), vitalité ($p=0,00006$) et la mobilité ($p=0,047$). Par contre, nous n'avons pas trouvé de corrélation statistique entre le DFI et la morphologie des spermatozoïdes. D'autres études ont retrouvé des tendances semblables entre le DFI et les paramètres du spermogramme (73-77).

Un DFI modéré ou élevé peut s'expliquer par l'effet délétère qu'exercent les DRO lorsqu'ils sont présents en grande concentration. En effet, les DRO peuvent induire une peroxydation des lipides de la membrane spermatique entrainerait une détérioration des structures axonémales des spermatozoïdes tout en réduisant, ainsi, leur mobilité (asthénospermie) (78). Les DRO peuvent également endommager l'ADN des spermatozoïdes, diminuer la vitalité ainsi que leur concentration (79,80).

Les résultats de notre étude approuvent l'importance de l'analyse de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (par la technique SCD) en complément des analyses de spermogramme et de spermocytogramme en vue de l'exploration de l'infertilité masculine. La technique SCD doit également être recommandée avant toute procédure de PMA, car la SCD peut révéler des cassures de l'ADN spermatique. Par conséquent, des individus présentant un risque accru de défaillance de la reproduction peuvent être identifier afin de faciliter l'élaboration d'un conseil génétique approprié et aussi de délivrer un traitement aux hommes porteurs de ces anomalies.

CONCLUSION

7. CONCLUSION

Nous avons analysé la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes des hommes ayant des paramètres spermatiques normaux et anormaux. Les résultats de cette étude indiquent qu'une augmentation significative de la fragmentation de l'ADN spermatique, évaluée par la technique de dispersion de la chromatine (SCD), peut être trouvée dans le sperme des hommes avec un spermogramme normal. Par conséquent, l'analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique peut révéler des dommages à l'ADN du sperme chez les infertiles classés comme idiopathique sur la base des paramètres de sperme normaux.

L'étude de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est une méthode essentielle et complémentaire des analyses de routine dans la prise en charge des individus présentant une infertilité masculine et de la procréation médicalement assistée. D'un autre côté, il serait intéressant de faire une étude sur le long terme en effectuant des tests répétés sur les individus afin de savoir si la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est un phénomène réversible dans le temps, de faire aussi l'étude sur une plus grande population d'étude et enfin de valider le test et de le mettre sur le marché.

RECOMMANDATIONS

8. RECOMMANDATIONS

Au terme de cette étude, nous exprimons les recommandations suivantes :

Aux autorités politiques et sanitaires

- ❖ Eduquer la population sur la stérilité enfin qu'elle puisse comprendre que celle-ci n'est ni une fatalité, ni une malédiction mais un problème qui peut toucher tout le monde.
- ❖ Sensibiliser les hommes sur leur part de responsabilité en cas d'infertilité du couple.
- ❖ Financer des études de recherche sur l'infertilité au Mali
- ❖ Former le personnel de santé dans le domaine de la reproduction.
- ❖ Installer des structure (centre de fertilité) spécialisées dans les analyses en vue de l'exploration de l'infertilité masculine.
- ❖ Créer une unité d'assistance médicale à la procréation (AMP) dans les services publiques en vue d'une meilleure prise en charge des couples infertiles.

À la communauté scientifique et au personnel de santé

- ❖ Demander systématiquement un test de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes aux hommes même lorsque les résultats du spermogramme et du spermocytogramme sont normaux.
- ❖ Faire de plus en plus travaux des recherches dans le domaine de la reproduction.
- ❖ Continuer de sensibiliser les hommes sur leur implication possible en cas d'infertilité du couple.
- ❖ Assurer une très bonne collaboration entre professionnels de la sante afin de garantir une bonne prise en charge des couples infertiles.

À la population

- ❖ Faire régulièrement des analyses afin de vite déceler des problèmes d'infertilité
- ❖ Se diriger vers des structures spécialisées en cas d'infertilité
- ❖ Se soutenir mutuellement en cas d'infertilité du couple
- ❖ Participer aux études de recherche sur l'infertilité du couple

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 World health Organization (WHO). International classification of diseases 11th Revision (ICD-11) Geneva WHO.2018.
- 2 Brahem S, Jellad S, Ibala S, Saad A, Mehdi M. DNA Fragmentation status in patients with necrozoospermia. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2012; 58(6):319–23.
- 3 Perrin A, Nguyen MH, Bujan L, Vialard F, Amice V, Guéganic N et al. DNA Fragmentation is higher in spermatozoa with chromosomally unbalanced content in men with a structural chromosomal rearrangement. *Andrology*. 2013; 1(4): 632–38.
- 4 Lewis S E, Aitken R J. DNA Damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell tissue research*. 2005; 322(1): 33-41.
- 5 Agarwal A, Majzoub A, Baskaran S, Panner Selvam MK, Cho CL, Henkel R et al. Sperm DNA Fragmentation: a new guideline for clinician’s world *J men health*. 2020; 38(4): 412-471.
- 6 Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril*. 2005 ; 84(4) : 850-853.
- 7 Marc F, Siffroi J P. Génétique de l’infertilité chez l’homme, nouvelles approches. *Andrologie*. 2003 ; 13(2) :148–157.
- 8 Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod*. 2003 ;18(5) :1023-1028.
- 9 Humeau C, Arnal F. *Reproduction et développement*. Sauramps Medical 3ème édition revue et corrigée : vol 24 2008.

-
- 10 Morton DA, Foreman K, Albertine KH. Eds. Chapter 13 Male Reproductive System. In: The big picture: Gross Anatomy, Medical course and Step 1 Review. 2nd Edition. Mc Graw Hill-Education; 2018.
 - 11 Samir H, Elie S et al. Médecine et biologie de la reproduction des gamètes à la conception. Elsevier Masson. 2004 ; 2 ème édition : 386 pages.
 - 12 Peter D Turnpenny, Sian Ellard. Emery's Elements of Medical Genetics. 15th Edition: Elsevier;2017. 416.
 - 13 Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. Nat Genet. 2001; 28(1):82-6.
 - 14 Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z et al. Protamine 2 deficiency Leads to Sperm DNA Damage and Embryo Death in Mice. Biol Reprod. 2003; 69(1): 211–17.
 - 15 Wang C, Swerdloff R S. Limitations of Semen Analysis as a Test of Male Fertility and Anticipated Needs from Newer Tests. Fertility and Sterility. 2014;102(6):1502–7.
 - 16 Saleh R A, Agarwal A, Nelson DR, Nada E A, El-Tonsy M H, Alvarez J G et al. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. Fertil Steril. 2002;78(2):313-8.
 - 17 Agarwal A, Cho C L, Esteves S C. Should We Evaluate and Treat Sperm DNA Fragmentation? Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. 2016; 28(3):164–71.

-
- 18 Esteves SC, Sharma RK, Gosálvez J, Agarwal A. A translational medicine appraisal of specialized andrology testing in unexplained male infertility. *Int Urol Nephrol*. 2014; 46(6):1037-52.
- 19 Esteves SC, Sánchez-Martín F, Sánchez-Martín P, Schneider DT, Gosálvez J. Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Fertil Steril*. 2015 ;104(6) :1398-405.
- 20 Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, et al . Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med*. 2015;21(1):109-22.
- 21 Esteves SC. Novel concepts in male factor infertility: clinical and laboratory perspectives. *J Assist Reprod Genet*. 2016; 33(10):1319-1335.
- 22 Simon L, Emery BR, Carrell DT. Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. *Best Practice Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2017; 44:38-56.
- 23 Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril*. 2005;84(4):850-3.
- 24 Zini A, Kamal K, Phang D, Willis J, Jarvi K. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology*. 2001 ;58(2):258-61.
- 25 Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*. 2002;23(1):25-43.

-
- 26 Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998;13(4):896-900.
- 27 Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999;14(4):1039-49.
- 28 Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev.* 2003; 193:70-81.
- 29 Nandipati KC, Pasqualotto FF, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship of interleukin-6 with semen characteristics and oxidative stress in vasectomy reversal patients. *Andrologia.* 2005;37(4):131-4.
- 30 Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril.* 1979; 31(5):531-7.
- 31 Chen SJ, Allam JP, Duan YG, Haidl G. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Arch Gynecol Obstet.* 2013;288(1):191-9.
- 32 Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl.* 2014 ;16(1) :31-8.
- 33 O'Donnell L. Mechanisms of Spermiogenesis and Spermiation and How They Are Disturbed. *Spermatogenesis.* 2015;26(2) :979632.
- 34 Rousseaux S, Boussouar F, Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Curtet S et al. Molecular models for post-meiotic male genome reprogramming. *Syst Biol Reprod Med.* 2011;57(1-2):50-3.

-
- 35 Esteves SC, Agarwal A, Sijo J P. Male infertility: contemporary clinical approaches, andrology, ART and antioxidant. Cham Springer. 2020; 361–375.
- 36 Zorngiotti AW, Macleod J. Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil Steril* 1973;24(11):854–863.
- 37 Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, Robbins WA, Perreault SD. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod.* 2005 ;20(10) :2776-83.
- 38 Xu DX, Shen HM, Zhu QX, Chua L, Wang QN, Chia SE, Ong CN. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat Res.* 2003;534(1-2):155-63.
- 39 Bian Q, Xu LC, Wang SL, Xia YK, Tan LF, Chen JF et al. Study on the relation between occupational fenvalerate exposure and spermatozoa DNA damage of pesticide factory workers. *Occup Environ Med.* 2004 ; 61(12) :999-1005.
- 40 Sánchez-Peña LC, Reyes BE, López-Carrillo L, Recio R, Morán-Martínez J, Cebrián ME, Quintanilla-Vega B. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 ;196(1):108-13.
- 41 Elbardisi H, Majzoub A, Agarwal. *A Genetics of male infertility: a case-based guide for clinicians* Cham Springer 2020; 39–55.
- 42 Perrin J, Tassistro V, Mandon M, Grillo JM, Botta A, Sari-Minodier I. Tobacco consumption and benzo(a)pyrene-diol-epoxide-DNA adducts in

spermatozoa: in smokers, swim-up procedure selects spermatozoa with decreased DNA damage. *Fertil Steril*. 2011 ;95(6):2013-7.

43 Yang Q, Zhao F. Effect of paternal overweight or obesity on IVF treatment outcomes and the possible mechanisms involved. *Rep* 2016;(6):29787.

44 Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, Lewis SE. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod*. 2007;22(7):1871-7.

45 Agarwal A, Desai NR, Makker K, Varghese A, Mouradi R, Sabanegh E, Sharma R. Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an in vitro pilot study. *Fertil Steril*. 2009;92(4):1318-1325.

46 Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersbøll AK, Christensen P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 2006;21(6):1576-82.

47 Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson B. Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119(3):493–501.

48 Ouafia L L. Exploration de l'infertilité masculine à l'ouest Algérien à l'aide des techniques de FISH et TUNEL.[These de doctorat en science].Sidi Bel Abbès (Algerie) Université Djilali Liabès; 2017.

49 Duty SM, Singh NP, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Herrick RF, Christiani DC, Hauser R. The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environ Health Perspect*. 2003;111(9):1164-9.

-
- 50 Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 2003;24(1):59-66.
- 51 Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.* 2005;84(4):833-42.
- 52 World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen World Health Organization 2010;271.
- 53 A Kbirou , I Jandou, E Adnane, E Mohammed, A Moataz, D Mohammed. Profil épidémiologique et clinique de l'infertilité masculine : étude observationnelle transversale descriptive et analytique. *Sexologies.* 2022 31.2 (2022), 117–22 .
- 54 Bagayogo O. Etude des paramètres spermiologiques des hommes pour bilan d'infertilités du couple à la clinique Farako à propos de 100 cas. [Thèse de Médecine]. Bamako(Mali): Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako; 2020.
- 55 Demirkol MK, Barut O, Dogan NT, Hamarat MB, Resim S. At What Age Threshold does the Decline in Semen Parameters Begin? *J Coll Physicians Surg Pak* 2021; 31(01):4-7.
- 56 Batou A S, Abessolo F O, Mintsa A. Analyse des paramètres du spermogramme en relation avec le fructose, le citrate et l'alpha glucosidase neutre du sperme chez les hommes consultant pour infertilité à Libreville. *Int J Biol Chem Sci* .2018 ;12(6):2486-2502.

-
- 57 Sangare S. Contribution à l'étude des aspects étiologiques de l'infertilité masculine à la clinique FARAKO de Bamako [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali): Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako ;2021.
- 58 Cisse I K. Contribution à l'étude du tabagisme sur les paramètres spermiologiques [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali) : Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako ; 2008.
- 59 Coulibaly O. Caractéristiques cytospermiologiques de la stérilité masculine à propos de 598 examens. [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali) : Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako ; 2000
- 60 KAHAM P C. Analyses cytospermiologiques au service de cytogénétique et de biologie de la reproduction de l'INRSP (À propos de 860 cas). [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali): Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako;2005.
- 61 Kante A. Etude de la stérilité masculine au service d'urologie du CHU du point G. [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali) : Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako;2009.
- 62 Mumbere P,Sihalikyolo J,Ndungo E K , Baraka A, et al Les anomalies du spermogramme sont corrélées aux marqueurs biochimiques épидидymo vésiculaires des hommes infertiles Ann Afr Med 2022. 1 (15):15.
- 63 Tognifode M.V, Lokossou S, Aboubakar M, Ogoudjobi M, Hounkpatin B, Tonato-Bagnan A et al. Parametres du Spermogramme dans l'infertilite du Couple : Cas d'une Clinique Privee du Benin a propos de 210 Cas. J ournal de la société de biologie clinique du Bénin. 2018;(28): 41-45.

-
- 64 FG Epoupa Ngalle, LO Mbouche, EH Moby Mpah, JB Mekeme Mekeme, AQ Essomba, D Ebe Nkolo, D Feukam, F Angwafo III, ET Mboudo. Profil clinique et morphologique de l'infertilité masculine dans trois hôpitaux de référence de la ville de Douala au Cameroun. *African Urology*.2023; 03(2)
- 65 MEZIOUT I ; MERAD O La relation entre les perturbations des paramètres spermatiques et la fragmentation de l'ADN spermatique [Thèse de biochimie et biologie moléculaire]. Constantine (Algérie)Université de Constantine 1; 2014.
- 66 Guérin JF, Benchaïb M. Tests d'exploration de la qualité nucléaire du spermatozoïde: relations avec la fertilité et la qualité du conceptus [Assays for assessment of sperm DNA integrity: relationships with fertility and conceptus quality]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2004; 32(9):799-802.
- 67 JC Fouda, JB Mekeme Mekeme, P F Owon'Abessolo, LO Mbouche, FG Epoupa Ngalle, AS Nwaha Makon, M Biyouma, DC Mayopa, M Mekeme Yon, AA Mbassi, E Sobngwi,PJ Fouda, A Essomba. Aspects paracliniques de l'infertilité masculine à l'Hôpital Central de Yaoundé. *African Urology*.2023; 03(1).
- 68 Virro M R, Larson-Cook K L, Evenson D P. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2004;81: 1289-95
- 69 Bounartzi T, Dafopoulos K, Anifandis G, Messini CI, Koutsonikou C, Kouris S, Satra M, Sotiriou S, Vamvakopoulos N, Messinis IE. Pregnancy prediction by free sperm DNA and sperm DNA fragmentation in semen specimens of IVF/ICSI-ET patients. *Hum Fertil (Camb)*. 2016; 19(1):56-62.
- 70 Estefania M, Constanza B, Benzazian A, Lindl K, Peliquero A, Antonio C, Gnocchi D, Irigoyen M,Tessari L. Sperm DNA fragmentation and male age: results

of in vitro fertilization treatments. JBRA Assit Reprod. 2021; 25(4) : 533–539.

71 Clément P, Hammoud I, Molina Gomes D, Albert M, Selva J, Vialard F. Étude de la fragmentation de l'ADN spermatique et des aneuploïdies spermatiques en cas de fausses couches à répétition. Edimark, Pluteaux. 2009; 347 (6) : 28-33.

72 D Sakkas, Alvarez J G. Sperm DNA Fragmentation: Mechanisms of Origin, Impact on Reproductive Outcome, and Analysis. Fertil Steril. 2010;93(4):1027–36.

73 Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, Saad A. Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. Andrologia. 2009;41(6):383–6.

74 Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. Fertil Steril. 2008; 90(2):328-34.

75 Saleh A, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. J Androl.2002; 23(6):737-752.

76 Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, Prabakaran S, Tavares A, Sabanegh E. Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. Urology 2009;73(3) :461-9.

77 Okubo T, Onda N, Hayashi T, Kobayashi T, Omi K, Segawa T. Performing a sperm DNA fragmentation test in addition to semen examination based on the WHO criteria can be a more accurate diagnosis of IVF outcomes. BMC Urol. 2023; 29;23(1):78.

78 Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. Asian J Androl.2011;(13):36-42.

-
- 79 Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Alvarez JG, Fernández JL. Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl.* 2007 ;28(1):38-49.
- 80 Perrin A, Basinko A, Douet-Guilbert N, Gueganic N, Le Bris MJ, Amice V, De Braekeleer M, Morel F. Aneuploidy and DNA fragmentation in sperm of carriers of a constitutional chromosomal abnormality. *Cytogenet Genome Res.* 2011;133(2-4):100-6.

ANNEXES

10. Annexes



U.S.T.T-B

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT POUR LA PARTICIPATION À UNE ETUDE DE RECHERCHE



IDENTIFICATION

Nom de l'étude : Etude de la Fragmentation de l'ADN Spermatique par la Technique de Dispersion de la Chromatine des spermatozoïdes Chez les Hommes Consultant pour une Infertilité au Mali.

Etudiant(e) chercheur responsable de l'étude : Bintou Coulibaly

Numéro de téléphone : 78047667

Nom du participant :

Age :

Sexe :

Contact :

Introduction :

Vous êtes invité à prendre part à la présente étude de recherche entrant dans le cadre d'une thèse de Doctorat en Pharmacie de la Faculté de Pharmacie (FAPH) de l'université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako (USTTB).

Nous tenons à ce que vous ayez connaissance des points suivants :

-La participation à cette étude de recherche est entièrement volontaire.

-Vous pouvez choisir de ne pas y participer ou vous pouvez vous retirer de l'étude à tout moment ; dans ce cas, les renseignements vous concernant seront détruits.

-Vous demeurez libre de ne pas répondre à une question que vous estimez embarrassante.

-Votre participation ne vous procure aucun avantage financier. La recherche peut nous apporter des connaissances nous permettant de vous aider et d'aider d'autres personnes dans l'avenir.

BUT GÉNÉRAL :

Le but de cette étude consiste à **Déterminer le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes chez les hommes consultant pour une infertilité au Mali**. Cette étude est réalisée dans le cadre d'une thèse de Doctorat en pharmacie réalisée sous la direction du professeur Mahamadou Traore et du professeur Oumar Samassekou de la faculté de Pharmacie de l'USTTB.

PROCÉDURE(S) OU TÂCHES DEMANDÉES AU PARTICIPANT :

-Un questionnaire vous sera soumis sur vos antécédents personnels et familiaux entre autres. Un échantillon de votre sperme sera prélevé pour des examens lors de votre passage au Laboratoire.

-Un test de Fragmentation sera réalisé sur les spermatozoïdes présents dans le sperme : Technique SCD (Sperm Chromatin Dispersion).

Risques et avantages : -Lors du remplissage du questionnaire vous pouvez vous sentir mal à l'aise en raison de la difficulté de partager des renseignements personnels sur vos antécédents.

-Votre participation à cette étude peut ne pas vous procurer un avantage direct, mais peut nous permettre d'acquérir des informations susceptibles de nous aider à notre étude de recherche

ANONYMAT ET CONFIDENTIALITÉ

Il est entendu que les renseignements recueillis lors de l'entrevue sont confidentiels et que seuls, le responsable de l'étude et son directeur de recherche le professeur Mahamadou Traoré et Docteur Oumar Samassekou auront accès aux données de cette étude. Le matériel de recherche ainsi que votre formulaire de consentement seront conservés séparément sous clé par l'étudiant-chercheur responsable de l'étude.

COMPENSATION FINANCIÈRE

Votre participation à ce projet est offerte gratuitement. Un résumé des résultats de recherche vous sera transmis au moment opportun. Ce travail est effectué dans le cadre d'une thèse de doctorat en médecine

DES QUESTIONS SUR L'ETUDE OU SUR VOS DROITS :

Vous pouvez contacter l'étudiant-chercheur responsable de l'étude au numéro 78047667 ou à l'adresse mail :

bintoucoulibaly061@gmail.com. Pour des questions additionnelles. Vous pouvez également échanger avec le directeur de recherche Professeur Mahamadou Traore au numéro : 66723208 ou à l'adresse mail seybatraore@yahoo.fr ou avec le Professeur Oumar Samassekou au 68541075 ou à l'adresse mail : oumarbarou.samassekou@gmail.com des conditions dans lesquelles se déroule votre participation et de vos droits en tant que participant à cette recherche.

REMERCIEMENTS

Votre collaboration est importante à la réalisation de ce projet et nous tenons à vous en remercier par avance.

SIGNATURES

Je reconnais avoir lu le présent formulaire de consentement libre et éclairé et consens volontairement à participer à cette étude de recherche. Je reconnais aussi que le responsable de l'étude a répondu à mes questions de manière satisfaisante et que j'ai disposé suffisamment de temps pour réfléchir à ma décision de participer. Je comprends que ma participation à cette recherche est totalement volontaire et que je peux y mettre fin en tout temps, sans pénalité d'aucune forme ni justification à donner. Il me suffit d'en informer le responsable de l'étude.

Signature du participant : _____

Date :

Je déclare avoir expliqué le but, la nature, les avantages, les risques de l'étude et avoir répondu au meilleur de ma connaissance aux questions posées.

Signature de l'étudiant(e) _____

Chercheur responsable de l'étude :

Date :

FICHE SIGNALÉTIQUE DE LA THÈSE

Nom : Coulibaly

Prénom : Bintou

Adresse Email : bintoucoulibaly061@gmail.com

Pays : MALI

Année : 2022-2023

Titre de la thèse : Etude de la Fragmentation de l'ADN Spermatique par la Technique de Dispersion de la Chromatine des spermatozoïdes Chez les Hommes Consultant pour une Infertilité au Mali.

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Pharmacie (FAPH). Université de Bamako.

Secteur d'intérêt : Cytogénétique, Génétique de l'infertilité masculine, Biologie moléculaire, Santé publique.

Résumé : L'infertilité est un problème majeur de santé publique. Longtemps considérée comme un problème purement féminin, aujourd'hui des recherches ont démontrées que l'infertilité masculine se révèle être la cause d'un tiers des cas infertilités du couple. Les causes de l'infertilité masculine sont multiples, et la fragmentation de l'ADN spermatique est considérée comme l'une des plus fréquentes. La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes consiste en des cassures ou des lésions dans le matériel génétique des spermatozoïdes. L'exploration de l'infertilité masculine est basée sur l'analyse conventionnelle du sperme particulièrement le spermogramme et le spermocytogramme. Cependant, ces derniers ne reflètent pas l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes

Objectif : Déterminer le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes chez les hommes consultant pour une infertilité.

Méthodes : Nous avons effectué le spermogramme et le spermocytogramme de 51 individus selon les normes établies par l'OMS. Nous avons par la suite étudié les niveaux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes au moyen de la Technique SCD grâce au SCA-SCOPE et les résultats ont été exprimés en %DFI. Les résultats que nous avons obtenus ont fait l'objet d'analyses statistiques.

Résultats : Parmi les 51 individus, 23 (45%) présentaient un spermogramme normal tandis que 28(55%) présentaient un spermogramme anormal avec un ou plusieurs des paramètres du spermogramme ou un spermocytogramme perturbés. Les tranches d'âge les plus représentées étaient 31-40 ans et 41-50ans. Le DFI au sein des individus avec un spermogramme normal était (modéré ou élevé) dans 56% des cas (13/23). Par ailleurs le DFI au sein des individus avec un spermogramme anormal était (modéré ou élevé) dans 75% des cas (21/28). En outre nous avons trouvé une corrélation significative entre : %DFI élevé et une faible vitalité ($r = -0,583$; $p < 0.01$), entre %DFI élevé et une faible mobilité ($r = -0,334$; $p = 0.016$) et aussi entre un %DFI élevé et une faible concentration de spermatozoïdes ($r = -0,302$; $p = 0.031$).

Conclusion : Enfin, les données de cette étude montrent à suffisance que la technique SCD est essentielle dans la prise en charge de l'infertilité masculine au Mali.

INSTRUCTIONS

Surname: Coulibaly

Name: Bintou

Email address: bintoucoulibaly061@gmail.com

Country: MALI

Year: 2022-2023

Thesis Title: Study of Spermatic DNA Fragmentation by Sperm Chromatin Dispersion Technique in Men Consulting for Infertility in Mali.

Place of deposit: Library of the Faculty of Pharmacy (FAPH). University of Bamako.

Abstract: Infertility is a major public health problem. There are many causes of male infertility, and sperm DNA fragmentation is considered one of the most common. Sperm DNA fragmentation consists of breaks or lesions in the genetic material of sperm cells. The exploration of male infertility is based on conventional semen analysis, especially spermogram and spermocytogram. However, these do not reflect the integrity of sperm DNA

Objective : To determine the rate of sperm DNA fragmentation in men presenting for infertility.

Methods: We performed spermogram and spermocytogram of 51 individuals according to the standards established by the WHO. Subsequently, we studied the levels of sperm DNA fragmentation using the SCD technique using the SCA-SCOPE and the results were expressed in %DFI. The results we obtained were statistically analysed.

Results: Among the 51 individuals, 23 (45%) had a normal spermogram while 28 (55%) had an abnormal semen analysis with one or more of the semen parameters disturbed or a disturbed spermocytogram. The most represented age groups were 31-40 years and 41-50 years. DFI among individuals with a normal spermogram was (moderate or high) in 56% of cases (13/23). In addition, DFI in individuals with an abnormal spermogram was (moderate or high) in 75% of cases (21/28). In addition, we found a significant correlation between: %DFI high and low vitality ($r = -0.583$; $p < 0.01$), between %DFI high and low motility ($r = -0.334$; $p = 0.016$) and also between high %DFI and low sperm concentration ($r = -0.302$; $p = 0.031$).

Conclusion: Finally, the data from this study sufficiently show that the SCD technique is essential in the management of male infertility in Mali.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure