

Université de Montréal

Comparaison de deux nouvelles méthodes d'évaluation de la
fertilité masculine avec le spermogramme chez des patients
ayant recours à la fécondation *in vitro*

par

Annick Courchesne

Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Sciences Biomédicales

Décembre 2009

©, Annick Courchesne, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Comparaison de deux nouvelles méthodes d'évaluation de la fertilité masculine avec le spermogramme chez des patients ayant recours à la fécondation *in vitro*

Présenté par :
Annick Courchesne

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Michèle Brochu, président-rapporteur

Dr Gilles Bleau, directeur de recherche

Dr Puttaswami Manjunath, membre du jury

Résumé

Des facteurs masculins sont identifiés dans près de la moitié des cas d'infertilité. À ce jour, les tests évaluant la fertilité masculine demeurent peu prédictifs de la survenue d'une grossesse. Dans le but de pallier cette lacune, nous avons mis au point deux nouveaux tests mesurant l'intégrité de l'ADN et le temps de survie des spermatozoïdes.

Nous avons effectué une étude prospective portant sur 42 couples infertiles suivis en fécondation *in vitro* (FIV). Le spermogramme a été effectué selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et le temps de survie des spermatozoïdes exposés à un détergent cationique a été mesuré en observant la mobilité sous microscope. L'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes a été vérifiée par la nouvelle méthode de marquage radioenzymatique et par analyse de la structure de la chromatine (SCSA). Tous les tests ont été réalisés sur la partie des échantillons de sperme non utilisée par la clinique de fertilité. Le projet a été approuvé par le comité d'éthique du Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (CHUM) et les patients ont préalablement signé un formulaire de consentement éclairé.

L'analyse des paramètres du spermogramme et de l'intégrité de l'ADN n'a montré aucune différence statistiquement significative entre les données chez les couples avec ou sans grossesse. Cependant, le taux de grossesse biochimique était statistiquement plus élevé chez les couples dont le temps de survie des spermatozoïdes était long (>250 s) comparativement à ceux dont ce temps était court (≤ 250 s): 66% vs 27% respectivement ($p < 0,05$). Les taux de grossesse clinique et d'implantation étaient aussi plus élevés, mais les différences n'atteignaient pas le seuil de signification statistique.

Nos résultats confirment que le spermogramme et la mesure de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes ne sont pas de bons facteurs prédictifs des résultats de la FIV. Par contre, le test de survie des spermatozoïdes serait un meilleur indicateur de la possibilité d'une grossesse en FIV. L'amélioration de sa spécificité et un plus grand nombre de sujets sont nécessaires avant de proposer son application en clinique de fertilité.

Mots-clés : ADN, spermatozoïde, infertilité masculine, spermicide, fécondation *in vitro* (FIV), injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI), taux de grossesse

Abstract

Male factors are known to be involved in almost half of the couples consulting for infertility. To date, the tests for evaluating male fertility are poor predictors of pregnancy. We developed two new tests to evaluate sperm function: a sperm survival test and a new method to measure sperm DNA integrity.

This prospective study was conducted on 42 infertile couples undergoing *in vitro* fertilization (IVF). Assessment of sperm parameters was done according to the World Health Organization (WHO) criteria, and sperm survival upon exposure to a cationic detergent was measured by observing motility under the microscope. Sperm DNA integrity was verified by our new radioenzymatic method as well as by the sperm chromatin structure analysis (SCSA) method. All testing was performed on a remainder aliquot of the semen samples. The study was approved by the ethics committee of the Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (CHUM), and informed consent was obtained before inclusion.

Neither conventional semen analysis, nor sperm DNA fragmentation showed statistically significant difference between conception and non-conception cycles. However, the biochemical pregnancy rate was statistically higher in couples where the sperm survival time was long (>250 s) compared to short (≤ 250 s): 66% vs. 27% respectively, ($p < 0.05$). The clinical pregnancy rate and implantation rate were also higher but the differences did not reach statistical significance.

Our study confirms that conventional semen analysis and the assay for sperm DNA integrity are not reliable indicators of IVF outcome. In contrast, our new sperm survival test seems to be a better predictor of the pregnancy rate after IVF. Improvement of its specificity and a larger cohort of patients are necessary before proposing its regular application in IVF clinics.

Keywords: DNA, spermatozoa, male infertility, spermicide, *in vitro* fertilization (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI), pregnancy rate

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Liste des tableaux	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des signes et abréviations	viii
Remerciements	xii
1. Introduction.....	1
1.1 Introduction générale	1
1.2 L’infertilité	2
1.2.1 Les causes	2
1.2.2 Les techniques de PMA	4
1.3 La physiologie de la reproduction masculine.....	6
1.3.1 La fonction testiculaire	6
1.3.2 La spermatogenèse	8
1.3.3 La spermiogenèse	13
1.3.4 La maturation post testiculaire	17
1.4 L’évaluation de la fertilité masculine.....	17
1.4.1 Le spermogramme	17
1.4.2 Les tests d’évaluation des fonctions des spermatozoïdes.....	19
1.5 Problématique.....	19

1.6 La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes	20
1.6.1 Les causes possibles	20
1.6.2 Les techniques de mesure de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes...	23
1.6.3 L'impact de la fragmentation de l'ADN sur la fertilité masculine.....	27
1.6.4 La fragmentation de l'ADN et les résultats de la PMA.....	28
1.7 Effet du chlorure de benzalkonium sur les spermatozoïdes	30
2. Objectifs de l'étude	32
3. Matériel et méthodes	34
3.1 Sélection des sujets	34
3.2 Stimulation ovarienne et collecte des ovocytes	35
3.3 Insémination des ovocytes et transfert embryonnaire	36
3.4 Collecte des échantillons de sperme	36
3.5 Préparation du sperme pour la PMA	36
3.6 Spermogramme	37
3.7 Fragmentation de l'ADN	37
3.7.1 Analyse de la structure de la chromatine des spermatozoïdes.....	38
3.7.2 Méthode radioenzymatique	39
3.8 Test de survie des spermatozoïdes exposés à un agent spermicide	42
3.9 Évaluation statistique	43

4. Résultats.....	44
4.1 Données cliniques et résultats des tests de fertilité masculine chez les patients ayant participé à l'étude	44
4.2 Comparaison des variables du spermogramme en fonction des résultats de la PMA	48
4.3 Comparaison du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes en fonction des résultats de la PMA	48
4.4 Comparaison du temps de survie des spermatozoïdes en fonction des résultats de la PMA	50
5. Discussion.....	53
5.1 Le spermogramme et les résultats de la FIV	54
5.2 Les améliorations apportées à la technique de marquage radioenzymatique ...	55
5.3 La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et les résultats de la PMA.....	57
5.4 La survie des spermatozoïdes exposés au chlorure de benzalkonium	59
6. Conclusion et perspectives.....	65
7. Bibliographie	67

Liste des tableaux

Tableau I :	Résumé des données cliniques chez les patientes suivies en PMA.	45
Tableau II :	Résumé des résultats du spermogramme, des tests de fragmentation de l'ADN et de survie des spermatozoïdes	47
Tableau III :	Comparaison des variables de numération, de mobilité progressive et de morphologie des spermatozoïdes en fonction de la survenue ou non d'une grossesse.....	49
Tableau IV :	Comparaison du degré de fragmentation de l'ADN mesuré avec le marquage radioenzymatique et le SCSA en fonction de la survenue ou non d'une grossesse.....	49
Tableau V :	Comparaison des caractéristiques cliniques des patientes et des variables du spermogramme des patients en fonction du temps de survie des spermatozoïdes.....	51
Tableau VI :	Comparaison des résultats de la FIV en fonction du temps de survie des spermatozoïdes.....	52

Liste des figures

Figure 1 : Schéma des différentes composantes de l'axe hypothalamo-hypophyso- testiculaire	7
Figure 2 : Coupe transversale d'un tubule séminifère	10
Figure 3 : De la spermatogonie au spermatozoïde.....	12
Figure 4: Schéma de l'axonème du flagelle d'un spermatozoïde.....	16

Liste des signes et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
ATP	Adénosine triphosphate
AZF	Facteur d'azoospermie ou <i>Azoospermic factor</i>
BSA	Albumine sérique bovine ou <i>Bovine serum albumin</i>
CASA	Analyse du sperme assistée par ordinateur ou <i>Computer assisted sperm analysis</i>
CFTR	Régulateur de la perméabilité transmembranaire de la fibrose kystique ou <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CHUM	Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
CoCl ₂	Dichlorure de cobalt
cpm	Coups par minute
DFI	Index de fragmentation de l'ADN ou <i>DNA fragmentation index</i>
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine ou <i>Fluorescein iso-thiocyanate</i>

FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
FIVc	Fécondation <i>in vitro</i> classique
FSH	Hormone folliculo-stimulante ou <i>Follicle stimulating hormone</i>
GnRH	Hormone de relâche des gonadotrophines ou <i>Gonadotrophin releasing hormone</i>
hCG	Gonadotrophine chorionique humaine ou <i>Human chorionic gonadotrophin</i>
HCl	Acide chlorhydrique
hMG	Gonadotrophine humaine de ménopause ou <i>Human menopausal gonadotrophin</i>
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
ICR	Région de contrôle de l'empreinte ou <i>Imprinting control region</i>
ICSI	Injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde ou <i>Intracytoplasmic sperm injection</i>
<i>IGF2</i>	Facteur de croissance apparenté à l'insuline 2 ou <i>Insulin-like growth factor 2</i>
IUI	Insémination intra-utérine
LH	Hormone lutéinisante ou <i>Luteinizing hormone</i>

LHRH	Hormone de relâche de l'hormone lutéinisante ou <i>Luteinizing hormone releasing hormone</i>
NaCl	Chlorure de sodium
$O_2^- \cdot$	Anion superoxyde
$\cdot OH$	Radical hydroxyle
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBS	Tampon phosphate salin ou <i>Phosphate-buffered saline</i>
pH	Potentiel d'hydrogène
PMA	Procréation médicalement assistée
SCFA	Société canadienne de fertilité et d'andrologie
SCSA	Analyse de la structure de la chromatine des spermatozoïdes ou <i>Sperm chromatin structure assay</i>
SOR	Substances oxygénées réactives
TCA	Acide trichloroacétique
TdT	Désoxyribonucléotidyle exotransférase ou <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TP1 et TP2	Protéines de transition 1 et 2 ou <i>Transition proteins 1 and 2</i>

Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TUNEL	Marquage des brins d'ADN avec la désoxyribonucléotidyle exotransférase ou <i>Terminal uridine nick-end labeling</i>
UI	Unité internationale
WHO	World Health Organization

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Gilles Bleau pour sa confiance et son aide dans l'accomplissement de ce projet. Les années passées dans son laboratoire ont été très enrichissantes et toutes les connaissances apprises me serviront grandement dans le futur. Merci aussi à Mathieu Savaria-Houde pour son bon travail lors de son stage dans le laboratoire.

Je remercie également le personnel de la coordination de la clinique OVO Fertilité pour son aide indispensable dans le recrutement des patients et tout spécialement Suzanne Charland pour sa prise en charge des sujets dans les situations de conflit d'horaire.

J'aimerais finalement remercier Simon Phillips pour tout son support, ses précieux conseils et ses encouragements dans les moments difficiles, sans quoi je n'aurais pu mener à terme ce projet.

1. Introduction

1.1 Introduction générale

L'infertilité touche un nombre croissant de couples en âge de se reproduire. On explique ce phénomène par une plus grande initiative des couples infertiles à dévoiler leur infertilité et, de ce fait, à consulter un médecin et/ou par une augmentation réelle de l'incidence de cette maladie. Dans le monde, plus de 70 millions de couples souffrent d'infertilité (Boivin et coll. 2007). Les cliniques spécialisées se doivent donc de mettre tout en œuvre pour diagnostiquer et traiter les patients affectés.

Des facteurs mâles sont impliqués dans près de la moitié des cas d'infertilité. Cependant, les tests évaluant la fertilité masculine demeurent peu prédictifs de la survenue d'une grossesse : dans chaque cas, il s'est avéré difficile de définir une valeur seuil et les tests en disent peu sur l'aspect fonctionnel des spermatozoïdes. Ils font ainsi l'objet de nombreuses controverses quant à leur utilité dans le domaine de la procréation médicalement assistée (PMA). Jusqu'à maintenant, seul le spermogramme fait partie du bilan de routine de toutes les cliniques de fertilité. Ce mémoire explore en détail la composante masculine de l'infertilité et évalue deux nouvelles techniques de mesure de la fertilité masculine comparativement au spermogramme afin de déterminer leur utilité en fécondation *in vitro* (FIV).

1.2 L'infertilité

1.2.1 Les causes

L'infertilité est communément définie comme l'impossibilité pour un couple de concevoir une grossesse après douze mois de rapports sexuels non protégés (Liu et Handelsman 2003). Environ 15 à 20 % des couples en âge de se reproduire répondent à ce critère. Grâce aux traitements de première ligne, ou spontanément dans certains cas, 50% à 70% de ceux qui consultent obtiendront une grossesse durant l'année suivante, les autres devront recourir à des techniques de PMA (Hughes et Giacomini 2001).

Selon des statistiques récentes publiées par la Société Canadienne de Fertilité et d'Andrologie (SCFA) et portant sur l'année 2006, l'infertilité des couples traités par FIV était due à des facteurs féminins, masculins ou une combinaison des deux dans respectivement 30%, 32% et 14% des cas. L'infertilité d'origine inconnue, dite idiopathique (20% des cas) et des facteurs féminins multiples complètent le tableau. Les facteurs féminins les plus communément rencontrés sont l'endométriose, un facteur tubaire, une réserve ovarienne diminuée, une dysfonction ovulatoire et un âge maternel avancé (Gunby et coll. 2009).

L'homme contribue à l'infertilité chez près de 50% des couples (Gunby et coll. 2009). La fertilité masculine peut être affectée par des facteurs intrinsèques, telle une dysfonction de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire et des facteurs extrinsèques dont l'exposition prolongée à la chaleur ou à des produits chimiques. Des causes anatomiques,

comme une varicocèle ou une cryptorchidie durant l'enfance, peuvent également affecter la fertilité masculine (Weber et coll. 2005).

Des anomalies génétiques sont responsables d'environ 5% des cas d'infertilité masculine. Les anomalies du chromosome Y, tel que des microdélétions dans la région du facteur d'azoospermie (AZF), sont la cause principale des cas d'azoospermie (absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat) et d'oligozoospermie sévère (peu de spermatozoïdes dans l'éjaculat). Certains gènes autosomiques sont actuellement étudiés quant à leur rôle potentiel dans l'infertilité masculine. Par exemple, le gène *CFTR* (Régulateur de la perméabilité transmembranaire de la fibrose kystique) est muté chez environ 60-90% des patients présentant une absence congénitale des canaux déférents, une forme d'azoospermie obstructive (O'Flynn O'Brien et coll 2010).

Certaines habitudes de vie peuvent également affecter la fertilité masculine. En effet, bien qu'elles diffèrent dans leurs conclusions quant à la sévérité des effets délétères, plusieurs études ont démontré que le tabagisme peut altérer les paramètres du spermogramme (numération, mobilité, morphologie) et l'intégrité de l'acide désoxyribonucléique (ADN) des spermatozoïdes. Une étude publiée en 2003 par Kunzle et coll., portant sur l'effet du tabagisme chez les patients consultant en clinique de fertilité, a montré une diminution significative du nombre total de spermatozoïdes et de spermatozoïdes mobiles chez les fumeurs comparativement aux non fumeurs. Le pourcentage de formes normales était également diminué.

La consommation aigue ou chronique d'alcool peut aussi affecter la fertilité masculine. Il est bien documenté que l'éthanol supprime l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire entraînant ainsi une diminution importante des hormones essentielles à la production des spermatozoïdes (Gordon et coll 1976, Ren J.C. 2005).

Le manque d'exercice et une mauvaise alimentation sont des facteurs de risque de l'obésité. Les hommes souffrant d'embonpoint ou d'obésité présentent souvent un profil altéré des hormones de la reproduction se caractérisant entre autres par un taux diminué de testostérone. Ils sont également plus à risque d'éprouver des problèmes érectiles (Chavarro 2010).

1.2.2 Les techniques de PMA

On regroupe sous le vocable PMA les techniques telles que les inséminations intra-utérines (IIU), la FIV, l'injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI), le prélèvement chirurgical de spermatozoïdes, le transfert d'embryons frais ou congelés et le don de gamètes, qui aideront les couples infertiles à obtenir une grossesse. Depuis 1978, date de la naissance du premier bébé issu de la FIV, environ trois millions d'enfants sont nés de par le monde grâce à ces techniques. Au Canada, environ 1% des grossesses en résultent (Aitken et coll. 2008, Gunby et coll. 2006, Statistiques Canada).

La FIV est effectuée en plusieurs étapes. Les ovaires produisent plusieurs follicules qui seront recrutés suite à une stimulation par des hormones exogènes administrées selon

différents types de protocoles. Dans les protocoles long et court, un agoniste de l'hormone de relâche des gonadotrophines (GnRH) est utilisé à faible dose dès le début de la stimulation pour supprimer les effets des hormones endogènes, évitant ainsi le risque d'ovulation prématurée (Hughes et coll. 1992). Le protocole antagoniste utilise plutôt un antagoniste de la GnRH qui, par son effet immédiat, peut être administré seulement quand les follicules ont atteint le stade pré ovulatoire. Lorsqu'administré au milieu de la phase folliculaire, l'antagoniste de la GnRH exerce un rôle de contrôle de l'ovulation plutôt que de suppression de la fonction ovarienne, ce qui augmente cependant le risque d'ovulation prématurée. L'utilisation d'un antagoniste de la GnRH diminue la durée du traitement, ce qui a pour effet d'améliorer le confort de la patiente et de réduire la quantité d'hormones de stimulation administrée. Le protocole antagoniste est également utile chez les patientes avec réserve ovarienne diminuée dont les ovaires répondent peu au protocole avec agoniste (Olivennes et coll 1995).

Les ovocytes des follicules sont récupérés lors de la ponction folliculaire et fécondés soit par fécondation *in vitro* classique (FIVc : mélange des ovocytes avec les spermatozoïdes) ou par ICSI (injection d'un spermatozoïde à l'intérieur de chaque ovocyte mature). Les embryons de bonne qualité sont replacés dans l'utérus de la patiente après deux, trois, ou cinq jours de culture.

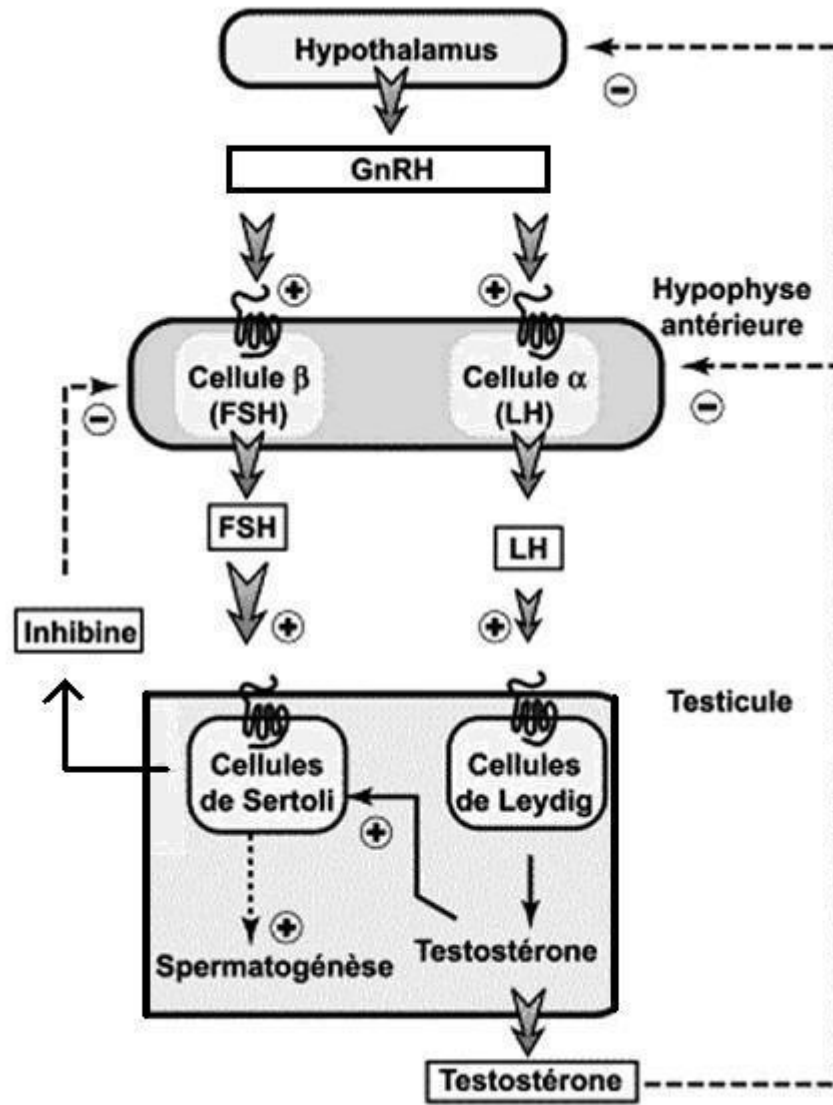
1.3 La physiologie de la reproduction masculine

1.3.1 La fonction testiculaire

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

La FSH, de concert avec la testostérone (androgène principal sécrété par les testicules), stimule le processus de la spermatogenèse. Un des nombreux effets de la FSH sur les cellules de Sertoli est d'entraîner la libération de lactate (substrat préféré au glucose par les spermatozytes de 1^{er} ordre) permettant de fournir l'énergie nécessaire aux cellules germinales en développement. La LH quant à elle agit sur les cellules de Leydig pour stimuler la biosynthèse de la testostérone (Liu et Handelsman 2003). Un schéma de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire est présenté à la figure 1.

La testostérone assure le maintien de la spermatogenèse via son action sur les cellules de Sertoli. La présence de récepteurs fonctionnels aux androgènes sur les cellules de la lignée germinale est encore aujourd'hui controversée. Cependant, certaines études ont démontré que l'expression de ces récepteurs est spécifique à l'état de développement des cellules germinales. Des techniques comme l'immunofluorescence ont permis de détecter la présence de récepteurs aux androgènes sur les spermatozoïdes humains, ce qui porte à



(Adapté de Quang Nhuan 2002)

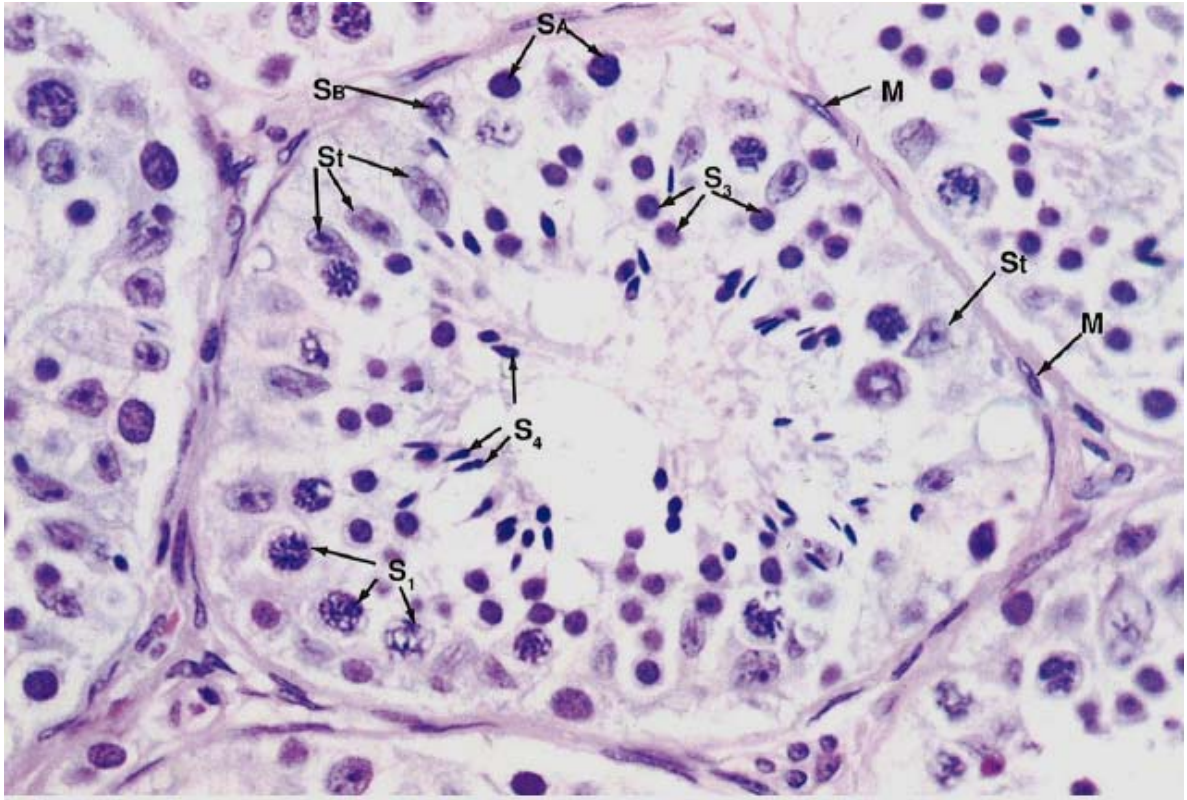
Figure 1 : Schéma des différentes composantes de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire

croire que ceux-ci pourraient jouer un rôle tôt dans la spermatogenèse (de Krester 2007, Wang et coll 2009). La testostérone exerce également un rôle dans la boucle de rétrocontrôle en inhibant la sécrétion de LH et de GnRH par l'hypophyse et l'hypothalamus respectivement. L'inhibine, une protéine sécrétée par les cellules de Sertoli, exerce un rétrocontrôle sur les cellules de l'hypophyse antérieure pour diminuer la sécrétion de la FSH (pour une revue récente de la littérature, voir de Krester 2007).

1.3.2 La spermatogenèse

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

Les spermatogonies sont les cellules germinales mâles retrouvées en périphérie dans les tubules séminifères. Une coupe transversale d'un tubule séminifère est présentée à la figure 2. Certaines spermatogonies subissent une série de divisions mitotiques permettant ainsi de maintenir leur nombre. Chez l'humain, on distingue deux types de spermatogonies; le type A et le type B (Clermont 1972). Les spermatogonies de type A sont dites $A_{pâles}$ ou $A_{foncées}$ selon leurs caractéristiques morphologiques (Clermont 1972, Amann 2008). Les cellules de type $A_{foncées}$ sont des spermatogonies de réserve se divisant rarement mais qui, sous l'effet d'un stimulus encore inconnu, se différencient en spermatogonies de type $A_{pâles}$.

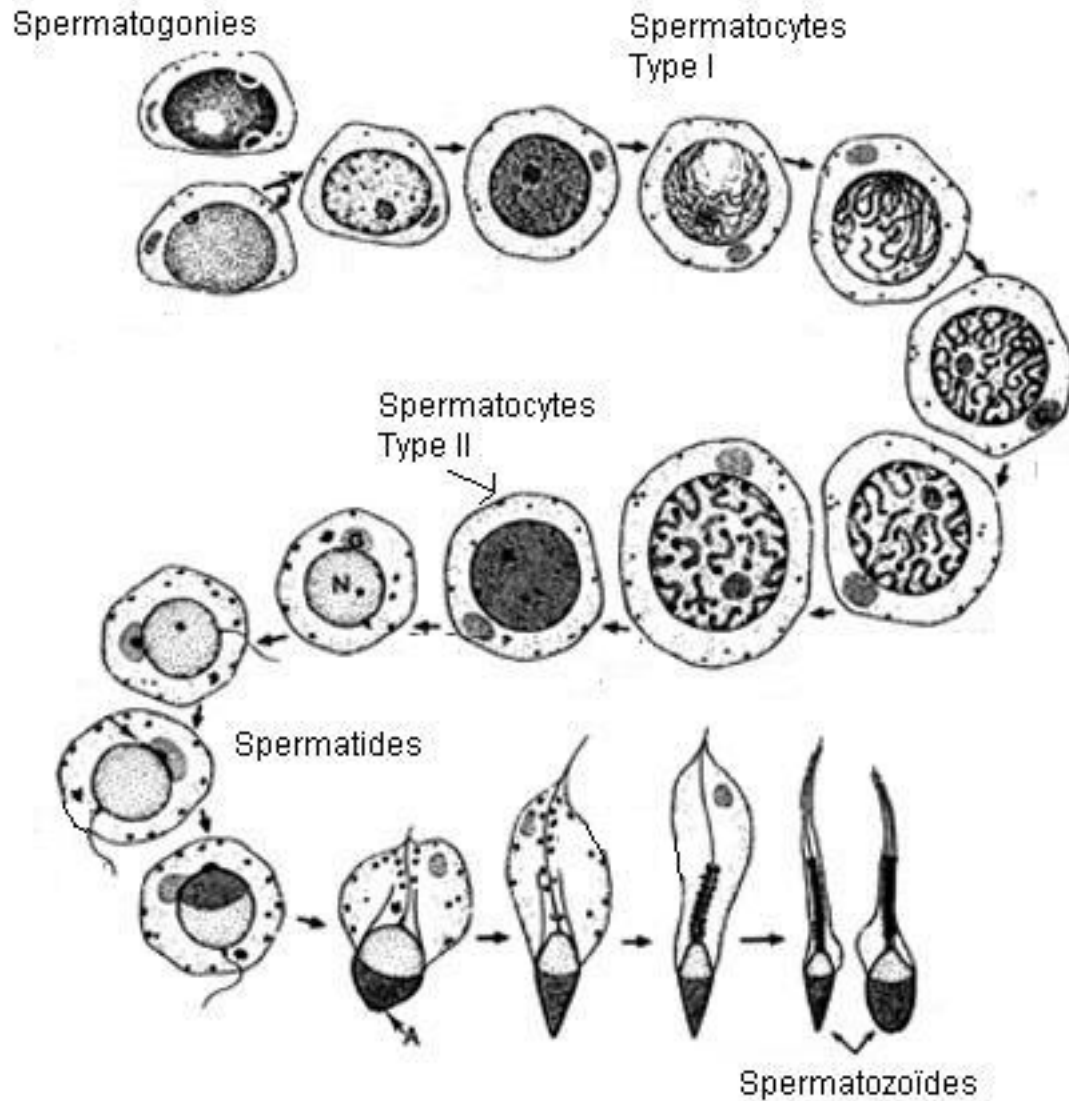


(Tiré de Young et Heath 2001)

Figure 2 : Coupe transversale d'un tubule séminifère. Les spermatogonies (S_A : spermatogonie de type A, S_B : spermatogonie de type B) se retrouvent près de la membrane basale, laquelle est entourée d'un chorion contenant plusieurs couches de myofibroblastes (M). Les spermatocytes de 1^{er} (S_1) et de 2^e ordre ainsi que les spermatides (S_3) se retrouvent dans la région près de la lumière du tubule. Les spermatozoïdes haploïdes (S_4) sont relâchés dans la lumière du tubule séminifère. Les cellules de Sertoli (St) servent de support aux cellules germinales.

Ces dernières peuvent demeurer au stade de cellules progénitrices ou se diviser en spermatogonies de type A_{pâles} engagées. Les spermatogonies de type A_{pâles} engagées se divisent ensuite pour former les spermatogonies de type B qui donnent les spermatocytes de stade préleptotène, soit les spermatocytes de 1^{er} ordre (Amann 2008, de Krester 2007).

Les spermatocytes de 1^{er} ordre subissent la première division de la méiose pour donner les spermatocytes de 2^e ordre qui, après la deuxième division de la méiose, forment les spermatides. Un schéma des différents changements cellulaires au cours de la spermatogenèse est présenté à la figure 3 (pour une revue récente de la littérature, voir Amann 2008).



(Adapté de Hermo et Clemont 1995)

Figure 3 : De la spermatogonie au spermatozoïde. Schéma des caractéristiques morphologiques des cellules tout au long du processus de la spermatogenèse et de la spermiogenèse.

1.3.3 La spermiogenèse

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

La morphogenèse de l'acrosome

Dans les spermatides rondes, des granules proacrosomiques formés dans l'appareil de Golgi fusionnent entre eux pour former un unique et large granule qui migre vers le noyau et recouvre, en une structure en forme de capuchon, 25 à 60 % de la région nucléaire. Ceci constitue la première étape dans la formation de l'acrosome. L'acrosome, dont le contenu peut changer durant le transit des spermatozoïdes dans l'épididyme, renferme des enzymes lysosomiaux (impliqués dans la pénétration du cumulus oophorus et de la zone pellucide) et d'autres protéines spécifiques (Kerr et coll. 2006).

La condensation nucléaire

Deux types de changements nucléaires surviennent durant la spermiogenèse. Il y a premièrement une réorganisation du noyau et du cytoplasme de sorte que la région du

noyau recouverte par le capuchon acrosomique se retrouve juxtaposée à la membrane plasmique (de Krester 2007). Deuxièmement, la majorité de la chromatine du noyau (environ 85%), jusque-là organisée en nucléosomes (organisation retrouvée dans les cellules somatiques), se condense pour donner une structure plus compacte. Lors de cette compaction, les nucléosomes sont d'abord progressivement désassemblés. Les histones (riches en lysine) sont ensuite remplacées par les protéines de transition 1 et 2 (TP1 et TP2), lesquelles sont à leur tour remplacées par les protamines (riches en arginine). Les protamines, fortement chargées positivement, se lient aux résidus phosphodiester chargés négativement de l'ADN pour former un complexe dont la charge est neutre (Oliva 2006). À ce jour, on ne connaît que très peu de la structure tertiaire de l'ADN des spermatozoïdes : certains modèles proposent un enroulement en forme de tore très compact (Ward 1993). Ce type de modèle permet un degré de compaction de l'ADN des spermatozoïdes 6 fois plus élevé que dans les cellules somatiques (Ward et Coffey 1991).

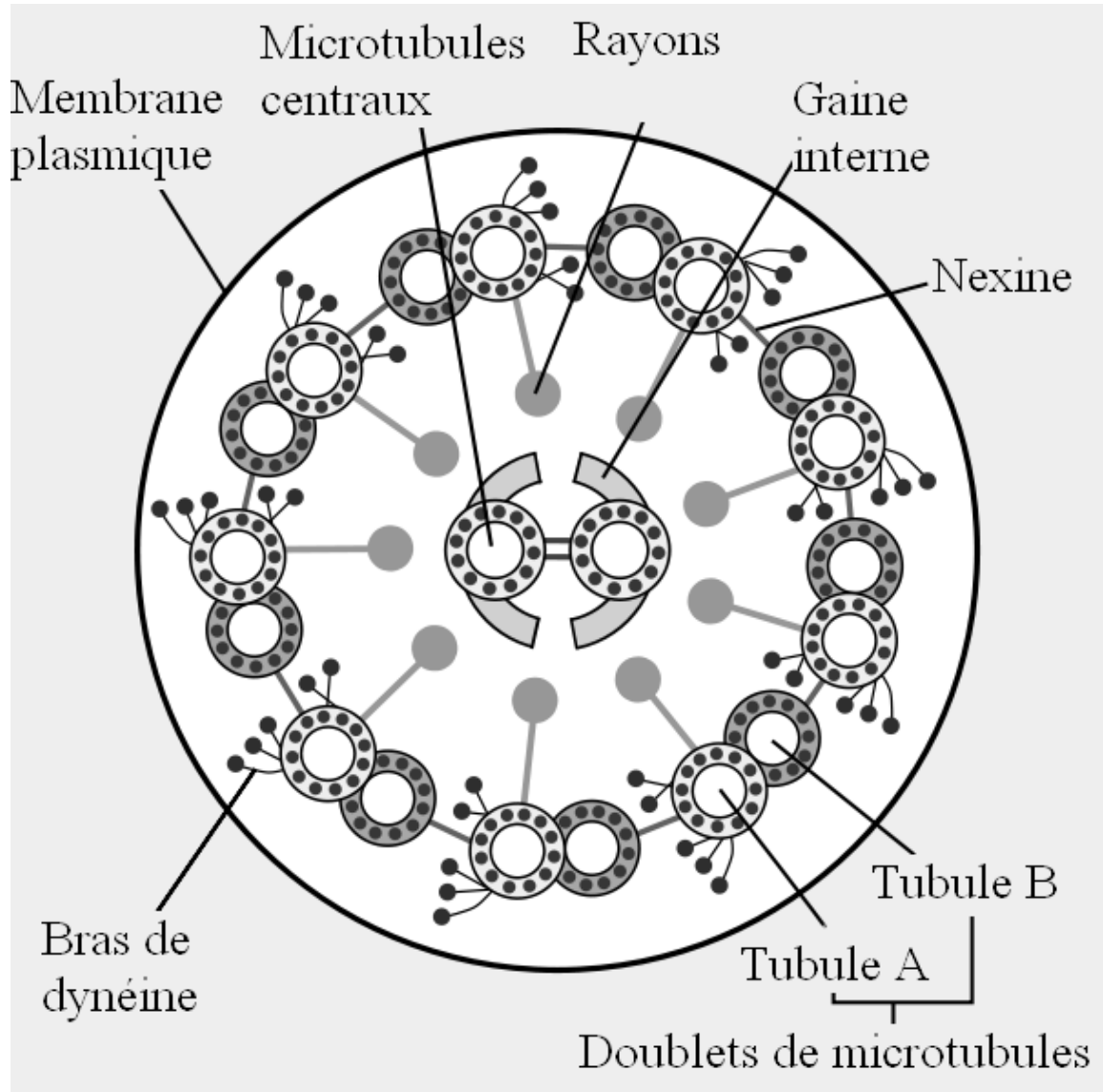
La transition « histones-TP-protamines » survient à un moment de répression totale de la transcription de l'ADN (Kerr et coll. 2006). La structure nucléoprotamine procure donc à l'ADN un environnement immédiat sécuritaire et résistant à des agents mutagènes de nature physique ou chimique; ceci améliore les chances que le matériel génétique paternel soit transmis intact à l'ovocyte (Rousseau et coll. 2005).

Le développement du flagelle

La formation du flagelle survient en début de spermiogenèse lorsque les centrioles de la spermatide se déplacent en périphérie, près de la membrane plasmique. Du centriole distal, situé à l'opposé de l'acrosome, surgit le filament axial dont la structure sera modifiée pour servir aux différentes régions du flagelle (Kerr et coll. 2006). Le corps central du filament axial est appelé l'axonème et est composé de 9 paires de microtubules entourant deux microtubules centraux. Un schéma de l'organisation des microtubules dans le spermatozoïde mature est présenté à la figure 4.

La réduction du cytoplasme et la réorganisation de ses organites

La structure modifiée de l'axonème formant le point d'articulation avec le noyau est la pièce de connexion (relie la pièce intermédiaire à la tête dans le spermatozoïde mature). Les fibres externes denses et l'enveloppe fibreuse sont développées au fur et à mesure que le processus de la spermiogenèse progresse. La pièce intermédiaire procure non seulement une stabilité au flagelle, mais pourrait aussi jouer un rôle d'échafaudage moléculaire dans le positionnement d'enzymes clés, tels que CatSper1 (hyperactivation et capacitation) et Calcium ATPase1 (hyperactivation) nécessaires à la mobilité du spermatozoïde (de Krester 2007). L'enveloppe de mitochondries de la pièce intermédiaire se forme à la fin de la réorganisation du cytoplasme et des organites. Les mitochondries restées en périphérie de la spermatide se rejoignent en spirale autour de la région proximale du flagelle (la pièce intermédiaire dans le spermatozoïde mature). Cette forme hélicoïde offre moins de



(Adapté de Lodish 1999)

Figure 4 : Schéma de l'axonème du flagelle d'un spermatozoïde. L'axonème est formé d'une paire de microtubules centraux simples entourés de 9 paires (doublets) de microtubules (A et B). Les bras de dynéine situés sur les tubules A utilisent l'adénosine triphosphate (ATP) pour produire une force de cisaillement contre les tubules B. Cette force est ensuite convertie en fléchissement. Les deux microtubules centraux pourraient réguler l'activité des bras de dynéine afin d'éviter que ceux-ci ne s'activent simultanément dans tout l'axonème, ce qui empêcherait tout mouvement (Omoto et coll. 1999).

résistance au fléchissement (Kerr et coll. 2006). Survient ensuite la séparation du spermatozoïde de la cellule de Sertoli (la spermiation) durant laquelle le cytoplasme, qui a migré en position caudale, est désagrégé et par la suite phagocyté par les cellules de Sertoli.

1.3.4 La maturation post testiculaire

Les spermatozoïdes relâchés dans la lumière des tubules séminifères ne sont pas encore fonctionnels et, de ce fait, sont incapables de féconder un ovocyte. C'est lors de leur passage dans l'épididyme qu'ils subiront une série de changements qui leur permettront d'acquérir leur pouvoir fécondant (mobilité progressive, habileté à féconder un ovocyte). Un de ces changements implique une modification, par des protéines de l'épididyme, de l'emplacement des lipides et des protéines de la membrane plasmique des spermatozoïdes afin de former des complexes de signalisation essentiels à la fécondation (Cornwall 2009).

1.4 L'évaluation de la fertilité masculine

1.4.1 Le spermogramme

Tel que spécifié dans les recommandations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la concentration, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes sont quelques-uns des critères les plus communément utilisés pour évaluer la fertilité masculine. Ces critères sont analysés lors de la réalisation du spermogramme, lequel inclut également la

mesure du volume et du pH ainsi que la détection des anticorps anti-spermatozoïdes; ces données permettent aux cliniciens de poser un diagnostic initial (WHO 1999, Lewis et coll. 2008). Les valeurs de références décrites dans le manuel de l’OMS concernant l’analyse des échantillons de sperme humain (volume : ≥ 2 mL, numération : ≥ 20 M/mL, mobilité : 25% rapide ou 50% rapide et lent etc.) sont utilisées dans la majorité des laboratoires d’andrologie. Dans la plus récente édition de ce manuel, aucune valeur de référence n’est toutefois donnée pour la morphologie. Il est cependant noté que des études à grande échelle utilisant les critères stricts de Kruger-Tygerberg sont en cours et que des données préliminaires suggèrent qu’une diminution du pourcentage de formes normales en dessous de 15% était prédictive d’une diminution du taux de fécondation en FIV. De plus, des méta-analyses ont démontrées qu’une valeur seuil aussi petite que 4% de formes normales (selon les critères stricts de Kruger-Tygerberg) serait plus précise pour cibler les sujets sous fertiles (Coetzee et coll. 1998, Van Waart et coll. 2001, van der Merwe 2005).

Les valeurs du spermogramme d’hommes dont la fertilité est démontrée et celles d’hommes infertiles se chevauchent grandement. Ce chevauchement rend difficile la prédiction de la survenue d’une grossesse. Les contradictions entre les études portant sur ce sujet résultent en grande partie de l’hétérogénéité des échantillons de sperme humains. En effet, le sperme est l’un des fluides biologiques les plus variables. Ses paramètres conventionnels varient selon le pays, la région, les individus et même selon les échantillons d’un même individu (Lewis et coll. 2008, Keel 2006). L’utilité du spermogramme dans l’évaluation de la fertilité masculine est donc limitée puisqu’il reflète mal le caractère fonctionnel des spermatozoïdes. Notons qu’il demeure incontournable car il permet

d'identifier des conditions dans lesquelles la reproduction naturelle est impossible : par exemple l'azoospermie, l'asthénozoospermie sévère (peu ou pas de spermatozoïdes mobiles dans l'éjaculat) et la nécrozoospermie (aucun spermatozoïde vivant dans l'éjaculat).

1.4.2 Les tests d'évaluation des fonctions des spermatozoïdes

Une variété de tests fonctionnels, tels les tests de survie, de pénétration de la glaire cervicale, d'interaction spermatozoïdes-zone pellucide ainsi que l'analyse assistée par ordinateur (CASA) ont été développés au cours des deux dernières décennies (Aitken 2006, Lewis et coll. 2008). Ces tests manquent souvent de reproductibilité et aucune valeur seuil précise ne permet leur utilisation dans l'évaluation clinique de routine (Lewis et coll. 2008). Les méthodes évaluant l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes feront plus loin l'objet d'une description détaillée.

1.5 Problématique

Les méthodes de PMA, particulièrement la FIV et l'ICSI, sont très exigeantes, tant du point de vue humain que financier. En raison de leur complexité, le taux de réussite de la PMA plafonne à environ 50%. Lorsqu'un couple s'investit dans un cycle de FIV, les cliniques de fertilité se doivent de mettre tout en œuvre pour atteindre le but ultime d'obtenir une grossesse à terme. Plusieurs laboratoires de recherche travaillent à développer de nouveaux moyens pour améliorer le taux de réussite. Une des approches consiste à

élaborer des techniques d'évaluation des spermatozoïdes permettant de n'utiliser que les meilleurs pour la fécondation.

L'amélioration des tests évaluant la fertilité masculine est importante autant du point de vue du médecin traitant que de celui des patients. En effet, ces tests diminueraient le nombre d'analyses diagnostiques demandées dans les cas d'infertilité idiopathique et de ce fait, les délais d'attente avant un traitement. Ils fourniraient un outil important aux médecins lors du choix du traitement approprié (ex : IUI, FIVc ou ICSI) ainsi que pour la préparation psychologique des patients quant aux chances de succès.

1.6 La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes

1.6.1 Les causes possibles

Malgré l'état compact de la chromatine des spermatozoïdes, leur ADN demeure vulnérable et peut être endommagé par des agents physiques (exposition des testicules à des radiations) et chimiques (chimiothérapie, pesticides, tabagisme). Le mécanisme exact par lequel les dommages à l'ADN surviennent est encore mal compris. Trois hypothèses ont à ce jour été avancées.

Le stress oxydatif

Les substances oxygénées réactives (SOR), dont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$) et les peroxydes de lipides, sont potentiellement toxiques pour les spermatozoïdes et plus particulièrement pour leur ADN (Warren et coll. 1987, Agarwal et Said 2003). Il a été démontré que la teneur en SOR est plus élevée dans le sperme des hommes infertiles (Makker et coll. 2009). À des concentrations physiologiques, les SOR participent au contrôle de l'activité génique et protéique nécessaire à la différenciation et au fonctionnement des spermatozoïdes. Cependant, à des taux élevés, ils seraient impliqués dans trois différents mécanismes associés à une chromatine endommagée : une activité anormale de la topoisomérase II, l'apoptose et la nécrose (Evensen et coll. 2002).

Un stress oxydatif dans le sperme peut résulter de la présence d'un nombre accru de leucocytes en réponse à une infection du tractus reproductif mâle (Aitken et Baker 1995). En fait, les leucocytes représentent la source majeure d'oxydants dans le sperme : ils peuvent produire, grâce à leur activité peroxydase, 1000 fois plus de SOR que les spermatozoïdes (Henkel et coll. 2005). D'un autre côté, le plasma séminal, formé des différentes sécrétions des vésicules séminales, de la prostate et des glandes bulbo-urétrales, est riche en antioxydants, il assure ainsi une protection aux spermatozoïdes contre les effets délétères des SOR. Cependant, un déséquilibre en faveur des SOR risque d'entraîner des brisures dans l'ADN des spermatozoïdes.

Une compaction défectueuse de l'ADN

Lors du processus de protamination, l'ADN est coupé par des nucléases endogènes telle la topoisomérase II. Les bris créés dans l'ADN réduisent la tension induite par la force de torsion de l'ADN, ceci facilite la libération des histones, l'entrée des protéines de transition et ensuite le remplacement par des protamines (McPherson et Longo 1992, Caron et coll. 2001). En conséquence, la persistance de cassures dans l'ADN pourrait être causée par une impossibilité de relier les bouts d'ADN clivés une fois les protamines en place ou encore par un défaut et/ou une interruption de la maturation nucléaire lors de la spermiogenèse (Manicardi et coll. 1995).

Un processus apoptotique interrompu

L'apoptose est une forme de mort cellulaire caractérisée par des changements morphologiques et biochimiques spécifiques tels que le bourgeonnement de la membrane cellulaire, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN génomique et l'exposition à la surface cellulaire de molécules de signalisation spécifiques à la phagocytose (Xu et Shi 2007).

Le processus apoptotique est nécessaire au maintien de l'homéostasie dans tous les systèmes du corps humain, notamment dans la production de gamètes. En effet, l'apoptose joue un rôle crucial dans la spermatogenèse en empêchant une surproduction de spermatozoïdes dans les testicules qui dépasserait la capacité de support des cellules de

Sertoli, ainsi qu'en abaissant le taux normal de prolifération en conditions inadéquates au développement optimal des spermatozoïdes (Sinha Hikim et Swerdloff 1999).

Les spermatozoïdes qui s'engagent dans la voie apoptotique, mais qui par la suite y échappent, peuvent présenter un taux plus élevé de fragmentation de leur ADN (The Practice Committee of the ASRM 2008). La stimulation d'une activité endonucléase calcium-magnésium dépendante entraîne le clivage de l'ADN entre les unités nucléosomiques, approximativement à toutes les 200 pb (Sinha Hikim et Swerdloff 1999). Les voies impliquant la protéine de surface Fas (exprimée sur la surface des cellules commises à l'apoptose) pourraient être à l'origine de l'apoptose des spermatozoïdes. Le pourcentage de spermatozoïdes positifs pour la protéine Fas est faible chez les hommes dont les paramètres du spermogramme sont normaux. Par contre, ce pourcentage peut atteindre 50% chez les hommes présentant un spermogramme anormal; la présence de spermatozoïdes possédant des marqueurs apoptotiques indique un processus d'apoptose inachevé chez ces sujets (Agarwal et Said 2003).

1.6.2 Les techniques de mesure de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes

Technique COMET

La technique COMET évalue les dommages à l'ADN en mettant en évidence les cassures simple et double brins. Cette technique fut développée en 1996 par l'équipe de Hughes et coll. Les spermatozoïdes, inclus dans une mince couche de gel d'agarose, sont

lysés (pH alcalin), exposés à un courant électrique et par la suite colorés avec un fluorochrome spécifique à l'ADN. Après coloration, la distribution de l'ADN des spermatozoïdes dans le gel d'agarose apparaît sous la forme d'une comète (Sergerie et coll. 2005). Un des principes de la technique COMET est que l'ADN double brin demeure dans la tête de la comète alors que les courts fragments d'ADN simple et double brins migrent vers l'anode formant ainsi la queue de la comète. Les variables mesurées dans l'analyse sont le diamètre du noyau et la longueur de la comète (Agarwal et Said 2003). Ainsi, un spermatozoïde dont l'ADN est considérablement fragmenté présentera une forte fluorescence dans la queue de la comète et un allongement de celle-ci. Aucune valeur seuil au-delà de laquelle la fertilité masculine serait affectée n'a encore été établie, limitant ainsi l'utilisation de cette technique en milieu clinique (Sergerie et coll. 2005).

Analyse de la structure de la chromatine des spermatozoïdes (SCSA)

Cette technique, décrite par Evenson et coll. (1980), repose sur le principe que la chromatine anormale des spermatozoïdes est hautement susceptible aux cassures induites par des conditions dénaturantes. Un léger stress (pH acide ou chaleur) est appliqué aux spermatozoïdes, dénaturant l'ADN et perméabilisant les membranes afin de permettre l'entrée d'un colorant, l'acridine orange. Les échantillons sont ensuite analysés en cytométrie en flux. Le degré de fragmentation de l'ADN est déterminé grâce aux propriétés métachromatiques de l'acridine orange : l'acridine orange émet une fluorescence verte (530 nm) lorsqu'elle s'intercale dans l'ADN double brin et rouge (600 nm) lorsqu'elle s'intercale dans l'ADN simple brin (Argawal et Said 2003, Sergerie 2005). Les résultats

sont exprimés en %, représentant l'index de fragmentation de l'ADN (DFI), en calculant le ratio fluorescence rouge : fluorescence totale (verte et rouge) (Evenson et coll. 2002). L'équipe d'Evenson a établi une valeur seuil à 30%, valeur au-delà de laquelle la probabilité de grossesse est diminuée (Evenson et coll. 2002). D'autres équipes, dont celle de Saleh et coll. (2002) et Spano et coll. (2000), ont par ailleurs établi des valeurs seuil à 24% et 20% respectivement, démontrant ainsi une variabilité entre les laboratoires.

Technique de marquage des brins d'ADN avec la désoxyribonucléotidyle exotransférase (TUNEL)

Le principe de la technique TUNEL, développée par Gorczyca et coll. (1993), est basé sur l'activité spécifique de la TdT à ajouter, sans matrice, des nucléotides marqués aux extrémités 3'OH des cassures simple et double brins de l'ADN. Dans la technique TUNEL, l'enzyme ajoute un complexe biotine-désoxyuridine aux extrémités 3'OH libres. La mesure de la fragmentation de l'ADN est ensuite effectuée en fluorescence après l'ajout du complexe streptavidine-FITC qui se lie à la portion biotine. Le signal est mesuré par cytométrie en flux ou microscopie à fluorescence (Argawal et Said 2003, Laforest et coll. 2004). Cependant, à cause de la condensation de la chromatine des spermatozoïdes, l'efficacité de cette technique est limitée par l'accès difficile de l'enzyme TdT aux extrémités 3'OH libres de l'ADN fragmenté (Laforest et coll. 2004). Plusieurs équipes ont utilisé la technique TUNEL afin d'établir une corrélation entre la fragmentation de l'ADN et les résultats de la PMA (taux de fécondation, de grossesse, d'implantation). Cette

technique n'est toutefois pas utilisée de façon courante en clinique, surtout à cause du manque de valeur seuil précise.

Test de dispersion de l'ADN des spermatozoïdes

Fernandez et coll. (2003) ont observé que les spermatozoïdes dont l'ADN est fragmenté échouent (après dénaturation, enlèvement des protéines nucléaires et coloration) à produire un halo d'ADN dispersé; ce halo est observé sur les spermatozoïdes dont l'ADN n'est pas ou très peu fragmenté. Bien que cette technique ait été validée par comparaison aux techniques de SCSA et TUNEL, elle n'est pas appliquée en clinique et on ne connaît pas de valeur seuil qui permettrait de prédire la survenue d'une grossesse.

Méthode radioenzymatique

Tout comme la technique TUNEL, la nouvelle technique de marquage radioenzymatique développée dans notre laboratoire se base sur l'activité de la TdT à ajouter des nucléotides marqués aux extrémités 3'OH des cassures simple et double brins de l'ADN. Cette technique est la première de son genre à permettre l'incorporation du dATP α ^{35}S dans l'ADN isolé selon la technique au thiocyanate de guanidine (Hossain et coll. 1998) plutôt que dans l'ADN encore compacté dans la tête du spermatozoïde. Elle a pour avantage de contrecarrer la possibilité que certaines extrémités 3'OH de l'ADN ne soient pas accessibles à la TdT.

1.6.3 L'impact de la fragmentation de l'ADN sur la fertilité masculine

L'impact de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes sur la fertilité masculine a été documenté par plusieurs équipes de recherche qui ont utilisé les différentes techniques mentionnées ci-haut. Zini et coll. (2001) ont observé une dénaturation de l'ADN mesurée par le SCSA et une fragmentation de l'ADN mesurée par la technique TUNEL significativement plus faibles chez les sujets fertiles (10% et 13% respectivement) que chez les sujets infertiles (25% et 28 % respectivement). Ils ont également observé une corrélation négative entre le pourcentage de spermatozoïdes avec dénaturation de l'ADN et la mobilité. La morphologie était aussi corrélée à la dénaturation de l'ADN. La fragmentation de l'ADN, quant à elle, était négativement corrélée avec la concentration en spermatozoïdes et leur mobilité.

L'équipe d'Evenson et coll. (1999) a quant à elle observé que la dénaturation de l'ADN, mesurée par la technique SCSA, était nettement plus élevée chez les patients ayant induit une grossesse après 9 mois d'essai comparativement aux patients ayant induit une grossesse après seulement 3 mois d'essai.

Bien que plusieurs facteurs contribuent à la probabilité d'obtention d'une grossesse, ces études démontrent que l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes joue un rôle important dans la fertilité masculine.

1.6.4 La fragmentation de l'ADN et les résultats de la PMA

Il est bien établi que les facteurs mâles constituent un des motifs majeurs de consultation en clinique de fertilité. Heureusement pour ces couples, les techniques de la PMA, telle que l'ICSI, s'avèrent efficaces contre l'infertilité masculine (Aitken et coll. 2008). Notons que même si l'ICSI rend possible la fécondation des ovocytes par des spermatozoïdes « défectueux » en termes de maturité, mobilité, morphologie et fragmentation de l'ADN, le risque d'une transmission paternelle de matériel génétique altéré et pouvant causer un effet négatif sur le développement embryonnaire n'en demeure pas moins important (Aitken et coll. 2008, Zini et coll. 2001).

Insémination intra-utérine

En 2002, l'équipe de Duran et coll. n'a rapporté aucune grossesse par IIU chez les couples dont la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes était supérieure à 12% selon la technique TUNEL. Bien que leur résultat était statistiquement significatif, le nombre de sujets était faible (n=154). Bungum et coll. (2007) ont également démontré que la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est associée à un faible taux de grossesse en IIU (n=387).

Fécondation in vitro

La relation entre l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes et les résultats de la FIVc et de l'ICSI a fait l'objet de nombreuses publications. Cependant, l'élaboration des protocoles d'étude et les faibles échantillonnages rendent difficile l'interprétation des résultats (Aitken et coll. 2008). Aucune étude n'a démontré une association entre les dommages à l'ADN des spermatozoïdes et les taux de fécondation en FIVc et en ICSI. Ce fait est toutefois attendu puisque ni la fécondation ni le développement embryonnaire précoce ne dépendent de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes ; le génome embryonnaire n'étant exprimé qu'après la deuxième série de divisions embryonnaires (Zini et coll. 2005).

Une revue de la littérature publiée en 2005 ne cite pas moins de huit études démontrant une association négative entre les taux de grossesse en FIVc et en ICSI et le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, avec des valeurs seuils variant selon le type d'analyse utilisé (Zini et coll. 2005).

D'un autre côté, un comité spécial, mis sur pied par l'ASRM et chargé d'étudier l'utilité des tests de la fragmentation de l'ADN chez les couples consultant en clinique de fertilité, n'a trouvé aucune association significative entre la fragmentation de l'ADN et les résultats de la FIVc et de l'ICSI (The Practice Committee of the ASRM 2006). Dans une publication récente, Collins et coll. (2008) ont évalué 13 études totalisant 2161 cycles de FIVc et d'ICSI. Suite à cette méta-analyse, ils ont observé une faible association entre la

fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et les chances de grossesse en FIVc et en ICSI. Même si elle était statistiquement significative, les auteurs ont cependant conclu que cette faible association ne constituait pas une indication clinique valable pour inclure l'analyse de la fragmentation de l'ADN parmi les tests de routine dans l'évaluation de la fertilité masculine. Ceci n'exclut pas la possibilité que des sous-groupes spécifiques de couples infertiles pourraient bénéficier de ce test.

Une association plus robuste semble exister entre les dommages à l'ADN des spermatozoïdes et les taux d'avortements spontanés après FIVc et ICSI (Aitken 2008). En effet, une revue systématique de 11 études impliquant 1549 cycles de FIVc et d'ICSI et incluant 640 grossesses et 122 avortements spontanés a démontré une association statistiquement significative entre les dommages à l'ADN des spermatozoïdes et les avortements spontanés (Zini et coll. 2008).

1.7 Effet du chlorure de benzalkonium sur les spermatozoïdes

Les spermicides sont des composés pouvant rapidement et efficacement tuer ou immobiliser les spermatozoïdes ou pouvant les rendre incapables de féconder un ovocyte, permettant ainsi un effet anti-fertilité (Lee 1996). Les agents surfactants, dont le chlorure de benzalkonium fait partie, comptent parmi les spermicides les plus utilisés. Le chlorure de benzalkonium est constitué d'une longue chaîne hydrocarbonée pouvant s'insérer dans la membrane plasmique et d'une portion chargée positivement, un résidu ammonium quaternaire. Ce spermicide augmente la perméabilité de la membrane plasmique des

spermatozoïdes avec fuite de composantes cellulaires. Ceci cause la mort cellulaire et de ce fait une perte irréversible de la mobilité (Creinin et Keith 1994).

Lors de travaux effectués dans notre laboratoire et portant sur l'action spermicide du chlorure de benzalkonium, nous avons observé que le temps de survie des spermatozoïdes exposés à une concentration de 0,01% de ce détergent variait considérablement d'un échantillon de sperme à l'autre (de quelques secondes jusqu'à plus de 30 minutes). Nos études antérieures (Bleau, données non publiées) ont montré que dans ces conditions, un temps de survie inférieur à 250 s était souvent associé à un problème de fertilité masculine.

Le test de survie développé dans notre laboratoire repose donc sur l'hypothèse voulant que la capacité des spermatozoïdes à résister à une concentration de 0,01% de chlorure de benzalkonium soit un bon indicateur de leur qualité, voire même prédictif de la survenue d'une grossesse dans le cadre de la PMA.

2. Objectifs de l'étude

Il est bien établi que des facteurs mâles sont responsables de l'infertilité d'une proportion importante de couples qui consultent pour ce problème. Cependant, l'évaluation de la fertilité masculine par le spermogramme, le CASA, les tests de pénétration de la glaire cervicale et d'interaction spermatozoïdes-zone pellucide ainsi que la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes sont peu prédictifs de la survenue d'une grossesse. Leur utilisation dans le contexte de la PMA est un sujet de vives controverses (Lewis et coll. 2008, The Practice Committee of the ASRM 2006, Collins et coll. 2008).

Dans notre laboratoire, nous avons développé deux nouvelles techniques d'évaluation de la fertilité masculine : le marquage radioenzymatique et la mesure du temps de survie des spermatozoïdes exposés au chlorure de benzalkonium. Ces deux nouveaux tests sont uniques et innovateurs puisqu'ils permettent respectivement la mesure des cassures de l'ADN isolé et la résistance des spermatozoïdes à un stress.

Le but de notre étude était d'évaluer l'utilité de ces deux tests de la fertilité masculine chez des patients ayant recours à la FIV. L'objectif principal était de déterminer si ces deux méthodes permettent de prédire les résultats de la FIVc et de l'ICSI. Bien qu'une augmentation du degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes n'affecte pas le taux de fécondation en FIVc et en ICSI, elle est prédictive du taux de grossesse (Zini et coll. 2005, Collins et coll. 2008). De plus, une augmentation du temps de survie des

spermatozoïdes exposés au chlorure de benzalkonium est prédictive d'un taux augmenté de fécondation et de grossesse. Afin de valider cette hypothèse, nos objectifs spécifiques étaient de :

1. Déterminer le taux de fécondation et de grossesse en fonction du degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes
2. Déterminer le taux de fécondation et de grossesse en fonction du temps de survie des spermatozoïdes exposés au chlorure de benzalkonium.

Les données recueillies ont été comparées à celles obtenues par le spermogramme et par la mesure de la fragmentation de l'ADN par la technique SCSA.

3. Matériel et méthodes

3.1 Sélection des sujets

Cette étude porte sur des patients ayant pris part à un cycle de FIV de décembre 2007 à août 2009 à la clinique OVO Fertilité, Montréal, Canada. Tous les hommes dont le spermogramme antérieur montrait une concentration plus grande ou égale à 1×10^6 /mL et un volume plus grand que 1 mL ont été admis dans l'étude. Les sujets féminins de 40 ans et plus et/ou avec une valeur de FSH au jour 3 supérieure à 10 UI/L ont été exclus. Les cycles de FIV naturelle, les dons d'ovocytes et les cycles utilisant du sperme cryopréservé, épидидymal ou testiculaire n'ont pas été retenus. Pour fins de comparaison des paramètres du spermogramme et de la fragmentation de l'ADN, les patients ont été séparés en deux groupes : avec grossesse et sans grossesse. Pour ce qui est du temps de survie, les données préliminaires d'une étude antérieure suggéraient une différence entre le temps de survie des spermatozoïdes chez des hommes fertiles vs chez des hommes consultant pour infertilité. Dans la présente étude, nous avons séparé les patients en deux groupes par rapport à la valeur seuil de 250 s de temps de survie des spermatozoïdes. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique du Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (CHUM) et tous les participants ont préalablement signé un formulaire de consentement éclairé.

3.2 Stimulation ovarienne et collecte des ovocytes

Les 42 patientes de l'étude ont toutes reçu une stimulation ovarienne soit en protocole long (n=21), antagoniste (n=10) ou court (n=11). Dans le protocole long, les patientes prennent d'abord un anovulant (Marvelon, Ferring, Canada) pour une période de 10 jours pour ensuite être désensibilisées à l'aide d'un analogue de la GnRH (Suprefact, Merck Frosst, Canada). Elles sont par la suite stimulées avec de la gonadotrophine humaine de ménopause (hMG) urinaire (Repronex, Menopur, Ferring, Canada), de la FSH urinaire purifiée (Bravelle, Ferring, Canada) ou de la FSH recombinante (Puregon, Merck Frosst, Canada; Gonal-F, EMD Serono, Canada). Les patientes sous protocole court commencent leur stimulation ovarienne au premier jour de leur menstruation et reçoivent deux mini doses d'un analogue de la GnRH (Suprefact, Merck Frosst, Canada) tous les jours jusqu'au déclenchement de l'ovulation alors que pour le protocole antagoniste, les patientes sont également stimulées à compter du jour 1, mais reçoivent un antagoniste de la GnRH (Orgalutran, Merck Frosst, Canada) seulement lorsque le follicule dominant atteint 14 mm. Les médicaments de stimulation sont les mêmes pour les trois types de protocole. Lorsqu'au moins trois follicules ont atteint une taille de 18 mm, l'ovulation est déclenchée avec de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) (Merck Frosst, Canada) pour imiter le pic de LH et la ponction folliculaire est effectuée 36 heures après.

3.3 Insémination des ovocytes et transfert embryonnaire

Les ovocytes sont inséminés par FIVc ou ICSI selon les protocoles standards, au maximum 40 heures après l'administration d'hCG. Les critères confirmant la fécondation sont la présence de deux pronuclei et de deux corps polaires environ 18 à 20 heures post insémination. La qualité embryonnaire est notée 42 et 66 heures après l'insémination et le transfert embryonnaire est fait deux ou trois jours après l'insémination. Tous les embryons surnuméraires de bonne qualité sont congelés une fois ce transfert réalisé. Une grossesse biochimique est qualifiée par la mesure de la β -hCG sanguine 14 jours après la ponction des follicules et une grossesse clinique objectivée sous échographie endovaginale par la présence d'un sac gestationnel et d'un cœur fœtal à 6 semaines de grossesse.

3.4 Collecte des échantillons de sperme

À la clinique de fertilité, les échantillons de sperme sont produits par masturbation dans un contenant de polypropylène stérile (Starplex, VWR, Canada) après deux à trois jours d'abstinence sexuelle. Un spermogramme standard est réalisé selon la technique décrite plus bas.

3.5 Préparation du sperme pour la PMA

Tous les échantillons de sperme sont lavés selon la technique utilisant un gradient de densité (Puresperm, Nidacon, Suède). Ce gradient est constitué de trois couches de 0,3

mL de solutions colloïdales à des densités différentes : 95%, 70%, 50%. Un volume de 1 mL de sperme est déposé sur la couche de 50% et le tout est centrifugé à $400 \times g$ pendant 20 minutes. Le culot est par la suite suspendu dans 2 mL de milieu de lavage (Gamete buffer, COOK, Canada) et centrifugé à $100 \times g$ pendant 10 minutes. Après deux lavages, le culot est conservé à 37°C jusqu'à l'insémination.

3.6 Spermogramme

Le spermogramme est effectué selon les recommandations de l'OMS (WHO 1999). Après une période de liquéfaction de 30 minutes à 37°C , le volume, la viscosité, les caractéristiques macroscopiques et le pH sont mesurés et notés. Un aliquote de 10 μL de l'échantillon de sperme est ensuite prélevé pour l'analyse de la mobilité au CASA. Une dilution appropriée est effectuée pour le décompte des spermatozoïdes sur hémacytomètre. La concentration et la mobilité sont évaluées en duplicata et une analyse statistique est faite pour s'assurer que les deux essais sont statistiquement semblables. Un frottis est réalisé avec 10 μL de sperme sur deux lames, lesquelles sont ensuite colorées selon une technique en trois étapes (STAT III, MidAtlantic Diagnostics, USA). La morphologie est évaluée selon les critères stricts de Kruger-Tygerberg (Kruger et coll. 1986).

3.7 Fragmentation de l'ADN

La partie des échantillons de sperme non utilisée pour la mise en fécondation des ovocytes lors du cycle de FIV est congelée dans l'azote liquide à -196°C , dans des

cryotubes de 0,5 mL (Nalgene, Fisher Scientific, Canada) et conservée jusqu'à l'analyse par le SCSA ou par la méthode radioenzymatique.

3.7.1 Analyse de la structure de la chromatine des spermatozoïdes

Les échantillons de sperme sont analysés afin de mesurer la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes selon la technique SCSA décrite antérieurement (Zini et coll. 2009). Les échantillons de sperme sont décongelés sur la glace et traités pendant 30 secondes avec 400 µL d'une solution, à pH 1,2, de Triton X-100 0,1% (Sigma, MO USA), de chlorure de sodium (NaCl) 0,15 M (Fischer Scientific, NJ USA) et d'acide chlorhydrique (HCl) 0,08 M (Fischer Scientific, NJ USA). Après 30 secondes, 1,2 mL d'un tampon de coloration, composé d'acridine orange 6 µg/mL (Sigma, MO USA), d'acide citrique 37 mM (Fischer Scientific, NJ USA), de Na₂HPO₄ 126 mM (Fischer Scientific, NJ USA), d'EDTA disodium 1 mM (Fischer Scientific, NJ USA) et de NaCl 0,15 mM, sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite placés dans un cytomètre en flux (BD FACScan, Becton Dickinson, San Jose, USA). Après 3 minutes d'exposition à l'acridine orange, un minimum de 10 000 spermatozoïdes provenant de 2 aliquotes est scanné et les résultats sont compilés dans un gestionnaire de données (CELLQUEST 3.1, Becton Dickinson) sur un ordinateur Power Macintosh 7600/132 (Cupertino, USA). Le logiciel WinList (Verity Softwarehouse, Topsham, ME) est utilisé pour créer les cytogrammes (fluorescence rouge vs verte), les histogrammes (nb total de cellules vs %DFI) ainsi que les valeurs en %DFI. Les résultats sont exprimés en moyenne des 2 aliquotes du % DFI.

3.7.2 Méthode radioenzymatique

Le choix de la méthode d'extraction de l'ADN dépend du nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Il est préférable d'extraire l'ADN selon la méthode élaborée pour 1 million de spermatozoïdes si peu de spermatozoïdes (moins de 25 millions) sont disponibles pour l'extraction. Cette technique utilise une solution de glycogène lié à un colorant qui précipitera avec l'ADN pour faciliter sa récupération.

Extraction de l'ADN de 25 millions de spermatozoïdes

L'ADN des spermatozoïdes est extrait selon la technique modifiée au thiocyanate de guanidine publiée par Hossain et coll. (1997). Un volume de sperme correspondant à 25×10^6 de spermatozoïdes est mélangé à 5 mL de tampon phosphate saline 1X (Dulbecco's PBS, Invitrogen, Canada) suivi d'une centrifugation à $950 \times g$ pendant 10 minutes. Le culot est ensuite lysé dans un tampon contenant du thiocyanate de guanidine 6 M (Sigma, Canada), du citrate de sodium 30 mM (Sigma, Canada), du sarcosyl 0,5% (Sigma Canada), de la protéinase K 0,2 mg/ml (Invitrogen, Canada) et du β -mercaptoéthanol 0,3 M (Sigma, Canada) à 55°C pendant 3 heures. Deux volumes d'isopropanol (EMD Chemicals Inc., Canada) sont ensuite ajoutés au lysat et le contenu du tube est doucement mélangé par inversion jusqu'à ce que les fibres d'ADN forment une boule compacte blanche. L'ADN est ensuite récupéré à l'aide d'une pipette de transfert, lavé deux fois dans l'éthanol 70%, dissous dans 300 μ L de tampon Tris-borate (Tris 13 mM; acide borique 4,5 mM) pH 8,5 et

laissé à 4°C pour une période de 24 heures. La solution d'ADN est ensuite dosée au spectrophotomètre à 260 nm et 280 nm pour évaluer la concentration en ADN et la pureté.

Extraction de l'ADN de 1 million de spermatozoïdes

La technique de lyse cellulaire pour l'extraction de l'ADN de 1 million de spermatozoïdes est la même que celle décrite ci-dessus. Après l'incubation à 55°C, les échantillons sont refroidis à température pièce et 3 µL d'une solution de glycogène lié à un colorant bleu (Glycoblue, Ambion Biosystems, USA) y sont ajoutés. Suite à l'addition de deux volumes d'isopropanol au lysat, le contenu des tubes est mélangé par inversion jusqu'à l'obtention d'un dépôt bleuté. Après incubation à -20°C pendant 15 minutes, les tubes sont centrifugés à 13 800 g pendant 15 minutes, après quoi le surnageant est enlevé. L'ADN est lavé 2 fois dans l'éthanol 70%, avec centrifugation à 13 800 × g entre les lavages. Le culot d'ADN est finalement dissous dans 150 µl de tampon Tris borate (Tris 13 mM; acide borique 4,5 mM) pH 8,5 et laissé à 4°C pendant 24 heures. La solution d'ADN est ensuite dosée par spectrofluorométrie en utilisant un colorant fluorescent pour acides nucléiques (SYBR Gold, Invitrogen, Canada) tel que décrit par le manufacturier.

Marquage par la technique radioenzymatique

La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est mesurée par marquage radioenzymatique par la TdT des extrémités 3'OH libres, avec l'ATP α ³⁵S (Redivue d'ATP α ³⁵S, PerkinElmer, Canada) comme substrat radioactif. Cette méthode, résumée dans les

lignes qui suivent, a été développée dans notre laboratoire (Laforest et coll. 2004). Un volume de solution d'ADN correspondant à 4 µg est incubé pendant 18 heures à 37°C avec une solution de marquage contenant 10 µL de tampon TdT 5X (cacodylate de potassium 1M, Tris-HCl 125 mM, BSA 1,25 mg/mL), 5 µL dichlorure de cobalt (CoCl₂) 25 mM, 25 U de TdT (Roche Diagnostics, Canada) et 15 µCi ATP α ³⁵S. Le volume final est ajusté à 50 µL avec de l'eau distillée. Après incubation, l'ATP α ³⁵S non incorporé est éliminé par chromatographie sur des colonnes de séphadex (Illustra MicroSpin G-25, G&E Healthcare, Canada) tel que décrit par le manufacturier. Cette étape est suivie d'une précipitation : 150 µL d'ARNt (ARNt 0,25 mg/mL dans du pyrophosphate de sodium 0,1 M) (Sigma, Canada) sont ajoutés à l'éluat obtenu après chromatographie, les acides nucléiques sont précipités avec 200 µL d'acide trichloroacétique (TCA) 25% (Fisher Scientific, Canada) et conservés sur la glace pour au moins 10 minutes. Le précipité est ensuite récupéré sur filtres dont les pores ont 5 µm (Millipore, Canada) et lavé dans l'ordre avec 10 mL de TCA 10% et 10 mL d'éthanol 95%. Les filtres sont ensuite transférés dans 5 mL de liquide à scintillation (Bio-Safe II, Research Products International Corp., USA) afin de mesurer la radioactivité dans un compteur beta (tri-carb 2800TR, Perkin Elmer, Canada).

Afin de s'assurer du bon déroulement de la technique de marquage, un témoin négatif ne contenant pas de TdT et un témoin positif pour lequel l'ADN avait été préalablement traité avec 40 U EcoR1 et 40 U BamH1 (New England Biolabs, Canada) ont été analysés lors de chaque essai.

Standard d'ADN

Afin de minimiser la variation inter-essai due, entre autres, aux différences d'activité spécifique du substrat radioactif, nous avons utilisé comme standard de l'ADN (1 μg) de spermatozoïdes dont le degré de fragmentation était connu. Cet ADN a été analysé lors de chaque série de marquage. D'un essai à l'autre, l'incorporation du substrat radioactif [nombre de coups par minute (cpm)] dans l'ADN de chacun des échantillons analysés a pu ainsi être normalisée.

3.8 Test de survie des spermatozoïdes exposés à un agent spermicide

Après une période de liquéfaction de 30 minutes, 10 μL de sperme sont mélangés à 50 μL d'une solution contenant 0,01% de chlorure de benzalkonium (Aromapharm, Irlande) dans 0,85% de NaCl. Un volume de 10 μL du mélange est prélevé et observé sous microscope, entre lame et lamelle, à un grossissement de 10X. Le temps de survie est mesuré à compter du moment où le sperme est mélangé à la solution de chlorure de benzalkonium jusqu'à ce que tous les spermatozoïdes perdent leur mobilité. Le test de survie est effectué en triplicata et les résultats correspondent à une moyenne des trois valeurs.

3.9 Évaluation statistique

Pour comparer les valeurs des paramètres du spermogramme et de la fragmentation de l'ADN entre les groupes avec et sans grossesse, nous avons utilisé le test de Mann-Whitney. L'analyse statistique des données cliniques des groupes dont le temps de survie des spermatozoïdes est ≤ 250 s et > 250 s a été réalisée par le test de t de Student et la comparaison des taux de grossesse et d'implantation par le test Fisher exact. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

4. Résultats

4.1 Données cliniques et résultats des tests de fertilité masculine chez les patients ayant participé à l'étude

Les données cliniques les plus pertinentes des patientes suivies en PMA sont résumées au tableau I. En conformité avec les critères d'exclusion mentionnés dans la section Matériels et méthodes, toutes les patientes avaient une réserve ovarienne normale (FSH au jour 3 inférieur à 10 UI/L) et l'âge moyen des patientes était de $33,9 \pm 2,9$ ans, la patiente la plus âgée avait 39 ans. Ces critères d'exclusion permettent d'éviter le biais du taux de grossesse évolutive (grossesse se poursuivant au-delà de 12 semaines) très faible rapporté chez les patientes de plus de 39 ans dont la réserve ovarienne est basse. L'ICSI a été effectuée dans les cas d'anomalies graves décelées au spermogramme et dans les cas d'échec de la fécondation en FIVc lors d'un cycle antérieur. Dans les cas d'infertilité inexplicée et sans aucune grossesse dans le passé, la FIVc a été réalisée sur la moitié des ovocytes et l'ICSI sur l'autre moitié. Deux patientes n'ont pas eu de transfert embryonnaire à cause d'une fécondation anormale ou d'un échec total de la fécondation. Dans la grande majorité des cas, deux embryons ont été remplacés. Le taux de grossesse biochimique par transfert était de 55% (22 grossesses pour 40 transferts), le taux de grossesse clinique de 48% et le taux d'implantation de 28%.

Tableau I : Résumé des données cliniques chez les patientes suivies en PMA.

Données cliniques	Valeurs
Âge ♀ (moyenne ± écart-type)	33,9 ± 2,9
FSH J3 ♀ (UI/L) (moyenne ± écart-type)	6,4 ± 1,6
Insémination	
FIVc n(%)	17 (40,5)
ICSI n(%)	17 (40,5)
FIVc/ICSI ¹ n(%)	8 (19,0)
Ovocytes récupérés (moyenne ± écart-type)	9,4 ± 4,6
Taux de fécondation (moyenne ± écart-type)	
FIVc (%)	63 ± 29
ICSI (%)	58 ± 22
Embryons remplacés (moyenne ± écart-type)	2 ± 1
Grossesse biochimique ² /transfert embryonnaire (%)	55
Grossesse clinique ³ /transfert embryonnaire (%)	48
Taux d'implantation ⁴ /transfert embryonnaire (%)	28

¹Dans certains cas, la FIVc a été effectuée sur la moitié des ovocytes et l'ICSI sur l'autre moitié

²Grossesse biochimique : taux sérique de β -hCG supérieur à 25 mUI/ml 14 jours post ponction folliculaire

³Grossesse clinique : présence d'un sac gestationnel et d'un cœur fœtal 6 semaines post ponction folliculaire

⁴Nombre de sacs gestationnels observés 6 semaines post ponction folliculaire / nombre d'embryons remplacés

Les résultats des tests pour évaluer la fertilité masculine sont résumés au tableau II. Le volume, la numération, la mobilité et le temps de survie des spermatozoïdes ont pu être mesurés chez les 42 sujets de l'étude. Cependant, dans certains cas, l'évaluation de la morphologie, le marquage radioenzymatique ou la technique SCSA n'ont pu être effectués dû à une coloration inadéquate, une trop faible récupération d'ADN ou un volume insuffisant de sperme. La technique SCSA et le marquage radioenzymatique ont été réalisés en duplicata alors que le temps de survie a été mesuré en triplicata. Ces données ont été analysées quant à leur pouvoir prédictif de la survenue d'une grossesse.

Toutes les médianes et les moyennes des paramètres du spermogramme rencontrent les valeurs de références établies par l'OMS (volume ≥ 2 mL, numération : $\geq 20 \times 10^6$ /mL, mobilité : 25% rapide ou 50% progressive) à l'exception de la morphologie pour laquelle la médiane était de 7%. Cette dernière est cependant plus élevée que la valeur seuil de 4% proposée par Coetzee et coll. 1998, Van Waart et coll. 2001 et van der Merwe 2005.

Les données présentées au tableau II montrent de grandes différences interindividuelles quant au taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, tant avec la technique de marquage radioenzymatique qu'avec la technique de SCSA. Le taux médian de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes mesuré par la technique SCSA est de 6,4 [5,1 ; 9,4], ce qui est en dessous des valeurs seuils déjà publiées (Evenson et coll. 2002, Saleh et coll. 2002, Spano et coll. 2000).

Tableau II : Résumé des résultats du spermogramme, des tests de fragmentation de l'ADN et de la survie des spermatozoïdes

Paramètres du spermogramme, fragmentation de l'ADN, test de survie	Valeurs
Âge ♂	36,2 ± 4,7
Volume (mL)	3,2 ± 2,0
Numération (10 ⁶ /mL)	52 [23 ; 117]
Mobilité	
Rapide (>25 µm/s)	31 [9;49]
Progressive ¹ (%)	45 [30 ; 58]
Morphologie ² (% normaux)	7 [3 ; 9]
SCSA (% DFI)	6,4 [5,1 ; 9,4]
Marquage (10 ³ cpm/µg)	25 [22 ; 146]
Temps de survie ³ (s)	670 [249 ; 1440]

¹Mobilité progressive = Inclus les spermatozoïdes de mobilité rapide (>25 µm/s) et lente (5-24 µm/s)

²Morphologie = % spermatozoïdes de morphologie normale

³Temps de survie = moyenne du temps de survie des spermatozoïdes mesuré en triplicata

Les valeurs sont présentées en médiane [Intervalle interquartile] ou en moyenne ± écart-type.

4.2 Comparaison des variables du spermogramme en fonction des résultats de la PMA

Nous avons effectué des analyses statistiques non paramétriques pour comparer les variables du spermogramme chez les groupes avec grossesse versus sans grossesse suite à une FIVc, une FIVc/ICSI ou une ICSI. Les résultats présentés au tableau III ne montrent aucune différence statistiquement significative entre les deux groupes quant à la numération, la mobilité progressive et la morphologie des spermatozoïdes.

4.3 Comparaison du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes en fonction des résultats de la PMA

Comme le démontrent les résultats des analyses statistiques présentées au tableau IV, les taux médians de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes chez le groupe avec grossesse ne sont pas statistiquement différents de ceux observés chez le groupe sans grossesse pour les deux méthodes effectuées. Nous avons aussi noté l'absence de corrélation (R de Person $< 0,1$) entre les taux de fragmentation de l'ADN mesurés par les deux techniques (marquage radioenzymatique et SCSA).

Tableau III : Comparaison des variables de numération, de mobilité progressive et de morphologie des spermatozoïdes en fonction de la survenue ou non d'une grossesse

	Groupes		Valeur p^*
	Avec grossesse	Sans grossesse	
Numération (10^6 /mL)	50 [20 ; 70] (n=21)	52 [25 ; 116] (n=19)	NS
Mobilité progressive (%)	36 [24 ; 62] (n=22)	48 [39 ; 56] (n=18)	NS
Morphologie (%normaux)	7 [3 ; 9] (n=20)	6 [4 ; 9] (n=18)	NS

*Test de Mann-Whitney. NS : non significatif ($p > 0,05$)

Les valeurs sont présentées en médiane [intervalle interquartile]

Tableau IV : Comparaison du degré de fragmentation de l'ADN mesuré avec le marquage radioenzymatique et le SCSA en fonction de la survenue ou non d'une grossesse

	Groupes		Valeur p^*
	Avec grossesse	Sans grossesse	
Marquage radioenzymatique (10^3 cpm/ μ g)	53 [11 ; 330] (n=20)	63 [29 ; 210] (n=14)	NS
SCSA	6,3 [4,9 ; 8,3] (n=18)	6,4 [5,0 ; 13,3] (n=17)	NS

*Test de Mann-Whitney. NS : non significatif ($p > 0,05$)

Les valeurs sont présentées en médiane [intervalle interquartile]

4.4 Comparaison du temps de survie des spermatozoïdes en fonction des résultats de la PMA

Tel que présenté au tableau V, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les groupes avec temps de survie des spermatozoïdes ≤ 250 s et > 250 s quant à l'âge des sujets, la concentration de la FSH des patientes au jour 3 du cycle menstruel, le nombre d'ovocytes récupérés, le taux de fécondation (FIVc ou ICSI) et le nombre d'embryons remplacés. De même, aucune des variables du spermogramme ne montrait de différence significative entre les deux groupes.

Le taux de grossesse biochimique par transfert embryonnaire est statistiquement plus élevé dans le groupe >250 s que dans le groupe ≤ 250 s : 66% vs 27% respectivement ($p = 0,03$) (voir tableau VI). Le taux de grossesse clinique par transfert embryonnaire et le taux d'implantation étaient également plus élevés dans le groupe >250 s que dans le groupe ≤ 250 s (55% vs 27% et 31% vs 19% respectivement), cependant, ces différences n'étaient pas statistiquement significatives.

Tableau V : Comparaison des caractéristiques cliniques des patientes et des variables du spermogramme des patients en fonction du temps de survie des spermatozoïdes

	Temps de survie des spermatozoïdes		Valeur p^*
	≤ 250 s	> 250 s	
Nombre de sujets	11	31	
Âge du conjoint	35,3 \pm 6,7	36,5 \pm 3,8	NS
Âge de la conjointe	33,3 \pm 3,9	34,1 \pm 2,6	NS
FSH J3 (UI/L)	6,5 \pm 1,4	6,4 \pm 1,7	NS
Numération (10^6 /mL)	30 [22 ; 61]	53 [27 ; 122]	NS
Mobilité progressive (%)	27 [27 ; 50]	46 [32 ; 59]	NS
Morphologie (% normaux)	5 [3 ; 9]	7 [5 ; 9]	NS
Nombre d'ovocytes récupérés	8 \pm 4	10 \pm 4	NS
Nombre d'embryons remplacés	2 \pm 1	2 \pm 1	NS

* Test t de Student et test de Mann-Whitney. NS : non significatif ($p > 0.05$)

Les valeurs sont présentées en médiane [intervalle interquartile] ou en moyenne \pm écart-type.

Tableau VI: Comparaison des résultats de la FIV en fonction du temps de survie des spermatozoïdes

	Temps de survie des spermatozoïdes		Valeur p^*
	≤ 250 s	> 250 s	
Nombre de sujets	11	31	
Taux de fécondation FIVc et ICSI (%)	64 ± 20	62 ± 23	NS
Taux de grossesse biochimique / transfert embryonnaire (%)	27	66	0,03
Taux de grossesse clinique / transfert embryonnaire (%)	27	55	NS
Taux d'implantation/ transfert embryonnaire (%)	19	31	NS

Le taux de fécondation correspond à la moyenne (\pm écart-type) des valeurs individuelles du taux de fécondation observé chez chacun des couples; les autres taux (%) correspondent à des proportions de couples dans chaque groupe.

*Les taux de fécondation ont été comparés par un test t de Student. Le test de Fisher exact a été utilisé pour les autres comparaisons. NS : non significatif ($p > 0,05$)

5. Discussion

Au départ, le but de notre étude était de développer un test qui permettrait de mieux évaluer la fertilité masculine chez les patients ayant recours à la FIV. Pour ce faire, nous avons utilisé deux nouvelles méthodes mises au point dans notre laboratoire : la mesure de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes par marquage radioenzymatique et un test de survie des spermatozoïdes exposés au chlorure de benzalkonium.

Dans ce projet de recherche clinique, nous avons dû apporter des améliorations à la technique de marquage radioenzymatique afin de la rendre plus reproductible et surtout applicable dans les cas de couples ayant recours à l'ICSI. Nous avons tout d'abord réussi à améliorer les techniques d'extraction et de dosage de l'ADN et à rendre ainsi le marquage radioenzymatique applicable aux cas d'oligozoospermie. Nous avons ajouté un complexe glycogène-colorant bleu à la solution de lyse juste avant la précipitation à l'isopropanol afin de permettre une meilleure récupération de l'ADN. Nous avons également changé le niveau d'acidité de la solution d'ADN en utilisant un tampon Tris-borate (Tris 13 mM; acide borique 4,5 mM) à pH 8,5 pour faciliter la dissolution de l'ADN. Nous avons ensuite développé une technique de dosage en spectrofluorométrie utilisant un colorant à acides nucléiques afin de détecter des faibles quantités d'ADN.

L'analyse des variables principales du spermogramme (la numération, la motilité et la morphologie) n'a révélé aucune différence statistiquement significative entre les groupes

avec grossesse et sans grossesse, après FIVc et/ou ICSI. Nous n'avons observé aucune relation statistiquement significative entre le degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et la survenue d'une grossesse suite à la FIVc ou l'ICSI. Aucune différence significative du pourcentage de fécondation (en FIVc et ICSI) n'a été observée quand nous avons comparé les groupes dont le temps de survie des spermatozoïdes était court (≤ 250 s) ou long (> 250 s). De façon étonnante, le taux de grossesse basé sur le dosage de la β -hCG est significativement plus grand dans le groupe dont le temps de survie des spermatozoïdes est long (> 250 s). Les taux de grossesse clinique et d'implantation eux aussi plus grand dans le groupe avec un long temps de survie des spermatozoïdes (> 250 s), cependant la différence avec le groupe ≤ 250 s n'est pas significative.

5.1 Le spermogramme et les résultats de la FIV

L'absence de corrélation entre les principales variables du spermogramme et les résultats de la FIV concorde avec ceux d'études déjà publiées (Borini et coll. 2006, Bungum et coll. 2007). Il est bien connu que les paramètres du spermogramme, pour un même individu, peuvent varier considérablement d'un échantillon à l'autre (Lewis et coll. 2008, Keel 2006). Une collecte incomplète de l'échantillon de sperme, l'activité des glandes sexuelles accessoires (prostate, vésicules séminales, glandes bulbo-urétrales), le nombre de jours d'abstinence sexuelle, la prise de médicaments, l'alimentation et une température corporelle élevée (fièvre) sont quelques uns des facteurs pouvant affecter les paramètres du spermogramme (Björndahl et Kvist 2003, Cooper et coll. 1993). Lorsque l'on compare des populations d'hommes fertiles et d'hommes infertiles, on observe un

chevauchement important des distributions des valeurs pour tous les paramètres du spermogramme. Cette analyse est donc très peu discriminante de la fertilité.

Avec l'avènement de l'ICSI en 1992, la technologie a transgressé presque toutes les lois naturelles régissant la fécondation : un spermatozoïde incapable de féconder *in vivo* devenait, grâce à l'ICSI, capable d'engendrer un embryon. Des causes d'infertilité autrefois absolues telles que la globozoospermie (tête sphérique et absence d'acrosome) ou le syndrome d'immobilité ciliaire (défaut structural du flagelle entraînant l'immobilité des spermatozoïdes) ont pu être traitées avec succès. Bien que certaines études aient démontré une corrélation entre les paramètres du spermogramme et d'autres tests d'évaluation de la fertilité masculine tels que ceux évaluant la structure et l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes (Zini et coll. 2001, Evenson et coll. 1999), l'utilité du spermogramme en PMA se limite à dire s'il y a des spermatozoïdes dans le sperme et s'ils sont mobiles et de forme normale. Aujourd'hui, on peut affirmer que seules des conditions extrêmes telles la nécrozoospermie et l'absence totale de spermatogenèse résistent au traitement par l'ICSI.

5.2 Les améliorations apportées à la technique de marquage radioenzymatique

La forme sous laquelle l'ADN réagit comme substrat représente une des différences majeures entre la technique TUNEL et le marquage radioenzymatique. Il s'agit d'un ADN encore accompagné de protamines et relativement compacte à l'intérieur du noyau du spermatozoïde dans le cas de la technique TUNEL, mais d'un ADN isolé et dissous dans le cas du marquage radioenzymatique. La forme dissoute réduit l'empêchement stérique et

pourrait donc révéler le vrai degré de fragmentation de l'ADN. Cependant, comme l'ADN isolé était initialement dissous dans l'eau distillée, ceci causait un problème important de solubilité se traduisant par une faible reproductibilité des résultats.

Durant une phase préliminaire de ces travaux de maîtrise, nous avons pallié cette difficulté en remplaçant l'eau par un tampon Tris-borate à pH 8,5 et à très faible concentration (Tris 13 mM; acide borique 4,5 mM). À pH alcalin, les bases azotées de l'ADN perdent des protons, se chargent négativement et se repoussent entre elles en raison de leur charge similaire. Nous avons observé que le pH alcalin et la faible concentration de la solution tampon facilitent la dissolution de l'ADN, permettent l'obtention de solutions plus homogènes et améliorent grandement la reproductibilité des résultats de la technique radioenzymatique (résultats non présentés).

Nous avons également dû résoudre un problème relié à la quantité d'ADN nécessaire à son isolement. En effet, pour précipiter l'ADN selon la technique originelle il fallait utiliser, au départ, un minimum de 25×10^6 spermatozoïdes. Or, dans le cadre du présent projet, nous voulions mesurer le degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes de patients dont le spermogramme est normal et de patients ayant recours à l'ICSI. Ce dernier groupe représentait un défi car ce type de patients présente très souvent une oligozoospermie sévère. Nous avons solutionné ce problème en ajoutant du Glycoblue® après la digestion des spermatozoïdes, juste avant l'addition de l'isopropanol pour la précipitation. Tout comme les acides nucléiques, le Glycoblue® précipite avec l'ajout d'isopropanol facilitant ainsi la récupération de l'ADN en augmentant la grosseur et

la visibilité du culot. Ce procédé de co-précipitation nous a permis d'isoler l'ADN d'aussi peu que 1 million de spermatozoïdes, permettant ainsi des mesures chez des hommes dont le sperme était utilisé pour insémination par ICSI.

Dans une troisième étape de nos travaux préliminaires, l'amélioration de la technique d'extraction de l'ADN décrite plus haut nous a obligés à augmenter la sensibilité de la méthode de dosage (A_{260nm}) pour évaluer la concentration ($\mu\text{g/mL}$) en ADN. En effet, nous devions maintenant mesurer l'ADN extrait de seulement 1 million de spermatozoïdes, ce qui est bien en dessous de la limite de détection par spectrophotométrie. En conséquence, nous avons appliqué une technique spectrofluorométrique utilisant le colorant pour acides nucléiques SYBR Gold® ; nous avons ainsi pu mesurer des concentrations d'ADN aussi faibles que 10 ng/mL. Ces améliorations ont permis d'utiliser le marquage radioenzymatique pour mesurer le degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes également dans les cas d'ICSI.

5.3 La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et les résultats de la PMA

Afin de pouvoir réaliser la fécondation et transmettre le matériel génétique paternel, le spermatozoïde se doit de posséder un ADN exempt de dommages majeurs. De façon logique, les tests mesurant l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, tels la technique TUNEL et le SCSA, reposent sur ce concept. Au début des années 2000, on a donc fondé de grands espoirs sur la possibilité que ces tests puissent prédire les résultats de la PMA.

Dans notre étude, nous avons mesuré l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes d'échantillons de sperme congelés dans l'azote liquide par deux méthodes différentes : le SCSA ainsi que par une méthode radioenzymatique. Il a déjà été démontré que l'analyse d'échantillons frais et congelés-décongelés donne des résultats comparables (Zini et coll. 2001). L'absence de corrélation entre la fragmentation de l'ADN et les résultats de la FIV était attendu dans le cas du SCSA car une méta-analyse de 13 études portant sur la FIVc et l'ICSI n'a montré aucune différence statistiquement significative du taux de grossesse entre les cas dits normaux ou anormaux de dommages à l'ADN (mesurés par SCSA ou TUNEL) (Collins J.A. et coll. 2008). Une revue récente de la littérature arrive à la même conclusion pour la FIV avec ICSI et ne détecte qu'une différence de 5% du taux de grossesse pour la FIVc (taux de grossesse de 34% dans le groupe «normal» vs 29% dans le groupe « anormal ») (Zini A. et Sigman M. 2009). Ces données récentes confirment les conclusions du comité de pratique de l'ASRM qui exprime l'avis que les méthodes actuelles de mesure de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes ne sont pas prédictives de l'issue du traitement (The Practice Committee of the ASRM, 2006; révision en 2008).

Les résultats de notre étude, même basés sur un nombre très limité de sujets, et surtout les données récentes de la littérature nous incitent à délaisser le SCSA comme indicateur de réussite de la FIVc et de l'ICSI. Nous ne voyons pas non plus l'utilité de cette méthode pour «valider» la méthode radioenzymatique.

Grâce à la méthode radioenzymatique, nous espérons trouver un degré de fragmentation de l'ADN plus faible dans les cas de grossesse après FIVc ou ICSI

comparativement aux cas d'échec. L'absence d'une différence statistiquement significative entre les cas de réussite et d'échec donne à penser que la méthode radioenzymatique, à son stade actuel de développement, ne serait pas plus discriminante que la technique TUNEL dont elle s'inspire.

Durant ces travaux, nous avons observé que tous les échantillons de sperme ne se comportent pas de façon identique lors de l'extraction de l'ADN : pour certains la dissolution de l'ADN est facile et plutôt rapide, pour d'autres la dissolution de l'ADN est plus lente. Ceci pourrait introduire un biais dans l'analyse, causé par des récupérations d'ADN différentes d'un échantillon à l'autre. Il serait intéressant de vérifier, par électrophorèse en champs pulsé (visualisation des gros fragments d'ADN) et électrophorèse habituelle en gel d'agarose, la taille des fragments isolés de chacun des types d'échantillons de sperme. Ceci pourrait mener à une amélioration rendant la technique plus prédictive des résultats de la FIV.

5.4 La survie des spermatozoïdes exposés au chlorure de benzalkonium

Le nouveau test de survie est le premier test qui utilise la résistance des spermatozoïdes à un spermicide comme indicateur de la fertilité masculine. Le chlorure de benzalkonium permet d'évaluer la stabilité de la membrane plasmique des spermatozoïdes dans laquelle il s'insère. Dans le test, un long temps de survie des spermatozoïdes exposés à une faible concentration de chlorure de benzalkonium serait un témoin de leur grande

résistance face aux nombreux agents nocifs qu'ils pourraient rencontrer dans leur cheminement jusqu'à l'ovocyte.

Les conditions dans lesquelles la fécondation s'effectue lors d'une FIVc diffèrent de celles qui prévalent *in vivo*. Lors d'une conception naturelle, les spermatozoïdes doivent parcourir un long trajet dans le tractus génital femelle avant d'atteindre le site de la fécondation. Durant ce cheminement, ils sont exposés, par exemple, au pH acide des sécrétions vaginales et aux agents qui induisent la capacitation dans les trompes de Fallope. En FIVc, les spermatozoïdes baignent dans un milieu de culture hautement favorable à leur survie et à la fécondation d'un ovocyte situé à proximité. En ICSI, le spermatozoïde est directement injecté à l'intérieur de l'ovocyte, éliminant ainsi tout facteur pouvant empêcher l'interaction spermatozoïde-ovocyte. Les conditions qui prévalent en FIVc et ICSI permettent donc la fécondation par des spermatozoïdes qui naturellement auraient échoué dans cette tâche. Ce dernier concept peut expliquer l'absence de différence significative dans les taux de fécondation entre les groupes dont le temps de survie des spermatozoïdes est court (≤ 250 s) ou long (> 250 s).

En s'appuyant sur le concept de stabilité de la membrane plasmique du spermatozoïde, nous proposons l'hypothèse que dans plusieurs cas de court temps de survie en présence de chlorure de benzalkonium (≤ 250 s), la membrane plasmique des spermatozoïdes qui ont réalisé la fécondation était légèrement anormale ou endommagée. Pas assez anormale pour empêcher la fécondation, mais assez pour permettre des dommages à des gènes paternels impliqués dans le tout début du développement

embryonnaire. Le court temps de survie permettrait de révéler la présence d'une telle anomalie du spermatozoïde. Une variante de cette hypothèse serait que l'anomalie de la membrane plasmique pourrait être associée, sans relation de cause à effet, à une anomalie de gènes paternels impliqués dans le développement. Ici encore, l'anomalie n'empêcherait pas la fécondation, mais interférerait tôt dans le développement embryonnaire.

À titre d'exemple, on peut citer l'*IGF2* (Facteur de croissance apparenté à l'insuline 2), un gène soumis à l'empreinte génomique. L'allèle fourni par le spermatozoïde est actif dans l'embryon alors que l'allèle maternel provenant de l'ovocyte ne l'est pas. Durant la spermatogenèse, une méthylation de la région *IGF2-H19* ICR (*IGF2-H19* région de contrôle de l'empreinte) permet la transcription du gène *IGF2* dans l'embryon. Il est intéressant de noter que des travaux chez le rat ont montré que l'administration de tamoxifène à des mâles cause une diminution de leur fertilité : le pouvoir fécondant des spermatozoïdes n'est pas affecté mais les pertes pré- et post-implantatoires sont importantes (Balasinor N et coll. 2002). Une étude récente effectuée par le même groupe a démontré une diminution significative de la méthylation de la région *Igf2-H19* ICR dans les spermatozoïdes des rats traités au tamoxifène (Pathak S et coll 2009).

L'analyse de la méthylation de l'ADN, en rapport avec des gènes paternels soumis à l'empreinte génomique et importants pour le développement embryonnaire, pourrait expliquer le résultat observé dans la présente étude; c'est-à-dire un pouvoir fécondant préservé mais des pertes embryonnaires survenant lorsque le conjoint montre un court temps de survie des spermatozoïdes exposés au chlorure de benzalkonium. Nous émettons

l'hypothèse que chez ces patients, une anomalie de la spermatogenèse serait à la fois responsable : 1- d'une altération de la membrane plasmique (insuffisante pour empêcher la fécondation mais donnant un court temps de survie) et 2- d'un défaut de méthylation de l'*IGF2-H19* ICR (responsable du développement embryonnaire anormal).

On sait que les ovocytes matures contiennent suffisamment de transcrits maternels et de protéines pour soutenir la fécondation et la première division cellulaire. Ce n'est qu'à la troisième division cellulaire que le génome embryonnaire s'active, avec biosynthèse des ARNm et des protéines embryonnaires (Tesarik 1988). C'est pourquoi l'arrêt de développement au-delà du jour trois peut être relié aux spermatozoïdes. Ainsi, dans des travaux futurs, il serait intéressant de voir si le développement des embryons jusqu'au stade de blastocyste est corrélé avec le temps de survie. Si tel était le cas, cela renforcerait le lien possible entre le taux de grossesse biochimique et le temps de survie des spermatozoïdes.

Il sera très important d'augmenter la puissance du test statistique en augmentant le nombre de couples afin de déterminer si le taux de grossesse clinique est lui aussi prédictif de la survenue d'une grossesse. Il semble en effet logique que le taux de grossesse clinique aille de pair avec le taux de grossesse détecté par le test au β -hCG, à moins que des gènes paternels spécifiques à un stade plus avancé du développement embryonnaire soient impliqués.

Dans sa forme actuelle, même s'il est plus performant que les autres analyses existantes, le test de survie des spermatozoïdes ne peut pas être utilisé en clinique pour

guider la décision d'entreprendre ou non un traitement par FIVc ou par ICSI. En effet, nous avons observé 3 cas de grossesse malgré un court temps de survie des spermatozoïdes. Dans les travaux futurs, il sera important d'en découvrir la (les) cause(s) et donc d'augmenter la spécificité du test. Chez certains patients, il est possible qu'une anomalie du liquide séminal sécrété par les glandes accessoires puisse contribuer à réduire à moins de 250 secondes le temps de survie des spermatozoïdes exposés au chlorure de benzalkonium, sans toutefois empêcher la survenue d'une grossesse. Par exemple, les spermatozoïdes ont une phospholipase A2 active en surface (Thakkar JK et coll 1984); cette enzyme peut catalyser la formation de lysophosphatidyle choline, un détergent cationique dont l'effet pourrait s'ajouter à celui du chlorure de benzalkonium. Dans le sperme, l'activité de l'enzyme est inhibée, entre autres, par de fortes concentrations en Zn^{2+} et est stimulée à de faibles concentrations de cet ion. Dans des travaux complémentaires, nous testerons l'hypothèse qu'une faible teneur en Zn^{2+} dans le sperme (observée dans des cas d'infection des glandes accessoires) puisse expliquer un temps «raccourci» de survie des spermatozoïdes exposés au chlorure de benzalkonium. D'autres propriétés du liquide séminal pourraient être impliquées telles un manque de substances anti-oxydantes (dont la vitamine C) et un surplus en fer (Fe^{+2} ; rôle dans la réaction de Fenton). Comme toutes ces substances peuvent être mesurées dans le liquide séminal, on pourrait comparer leur teneur dans les cas de courts temps de survie, avec versus sans grossesse.

Il est intéressant de souligner que le test pourrait être utile aux couples chez qui la FIVc et l'ICSI ont échoué à leur permettre de fonder une famille. Ces personnes souhaitent vivement comprendre pourquoi, malgré tous leurs efforts et tout l'argent investi, ils sont

confrontés à l'échec. Le test pourrait leur apprendre qu'une anomalie liée aux spermatozoïdes est probablement responsable et que les chances de succès, s'ils devaient faire une autre tentative, seraient faibles.

6. Conclusion et perspectives

Dans le cadre de ce projet de recherche clinique portant sur 42 couples infertiles et suivis lors d'un cycle de FIV, nos résultats indiquent que le test de survie des spermatozoïdes exposés au chlorure de benzalkonium est un meilleur indicateur de la survenue d'une grossesse en FIV que le spermogramme et la mesure de la fragmentation de l'ADN. Il faut cependant souligner que la spécificité du test de survie n'est pas encore assez grande pour permettre son application en clinique. Il sera important d'initier des travaux afin d'expliquer pourquoi certains couples obtiennent une grossesse alors que le test montre un temps anormalement court de survie des spermatozoïdes. Nous devons aussi répondre à la question : quelle est la nature du lien entre le temps de survie des spermatozoïdes et la survenue d'une grossesse? Nos données indiquent que la réponse ne tient pas au pouvoir fécondant des spermatozoïdes; une association impliquant l'intégrité de certains gènes paternels serait une avenue de recherche plus prometteuse.

Il sera également important de poursuivre l'étude afin d'inclure un plus grand nombre de sujets. Les travaux futurs pourraient être simplifiés en omettant certains tests telle la mesure de la fragmentation de l'ADN qui ne s'est pas avérée prédictive de la survenue d'une grossesse.

Les techniques de la PMA sont très coûteuses et le taux de réussite, dans les meilleures conditions possible, avoisine seulement 50%. De plus, un échec de la FIV peut

entraîner une détresse psychologique importante chez les couples, autant à cause des espoirs brisés que des sommes considérables d'argent investies. Pour ces raisons, il est impératif de poursuivre la recherche vers le développement d'un test capable de prédire avec grande exactitude la survenue d'une grossesse. Le test de survie des spermatozoïdes exposés au chlorure de benzalkonium est prometteur dans l'évaluation de la fertilité masculine. Il est peu coûteux, d'exécution très rapide, facile à réaliser et non invasif. Moyennant une spécificité accrue, ce test pourrait mieux préparer les couples quant à l'issue probable du grand projet qu'ils comptent entreprendre.

7. Bibliographie

Agarwal A. et Said T.M. *Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility*. Human Reproduction Update. 2003; 9(4): 331-345.

Aitken R.J. et Baker H.W. *Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans?* Human Reproduction. 1995; 10: 1736-1739.

Aitken R.J. *Sperm function test and fertility*. International Journal of Andrology. 2006; 29(1): 69-75.

Aitken R.J., De Iuliis G.N., McLachlan R.I. *Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line*. International Journal of Andrology. 2008; 32: 46-56.

Amann R.P. *The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans: A Need to Revisit?* Journal of Andrology. 2008; 29(5): 469-487.

Balasinor N., Gill-Sharma M.K., Parte P., D'Souza S., Kedia N., Juneja H.S. *Effect of paternal administration of an antiestrogen, tamoxifen on embryo development in rats*. Molecular and Cellular Endocrinology. 2002 Apr 25;190(1-2):159-66.

Banks S., King S.A., Irvine D.S., Saunders P.T.K. *Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa*. Reproduction. 2005; 129(4): 505-14.

Björndahl L. et Kvist U. *Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message*. Reproductive Biomedicine Online. 2003; 7: 440-448.

Boivin J., Bunting L., Collins J.A., Nygren K.G. *International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care*. Human Reproduction. 2007; 22: 1506-12.

Borini A., Tarozzi N., Bizzaro D., Bonu M.A., Fava L., Flamigni C., Coticchio G. *Sperm DNA fragmentation : paternal effect on early post-implantation embryo development in ART*. Human Reproduction. 2006; 21(11): 2876-2881.

Bungum M., Humaidan P., Axmon A., Spano M., Bungum L., Erenpreiss J., Giwercman A. *Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome*. Human Reproduction. 2007; 22: 174-179.

Caron N., Veilleux S., Boissonneault G. *Stimulation of DNA Repair by the Spermatidal TPI Protein*. Molecular Reproduction and Development. 2001; 58: 437-443.

Carrell D.T., Liu L., Peterson C.M., Jones K.P., Hatasaka H.H., Erickson L., Campbell B. *Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss*. Archives of Andrology. 2003; 49: 49-55.

Chavarro J.E., Toth T.L., Wright D.L., Meeker J.D., Hauser R. *Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic*. Fertility and Sterility. 2010; 93(7):2222-2231.

Clermont Y. *Kinetics of Spermatogenesis in Mammals: Seminiferous Epithelium Cycle and Spermatogonial Renewal*. Physiological Reviews. 1972; 52(1): 198-236.

Coetzee K., Kruger T.F., Lombard C.J. *Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review*. Human Reproduction Update. 1998; 4(1): 73-82.

Collins J.A., Barnhart K.T., Schlegel P.N. *Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization?* Fertility Sterility. 2008; 89(4): 823-31.

Cooper T.G., Keck C., Oberdieck U. Nieschlag E. *Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men.* Human Reproduction. 1993; 8: 1251-1258.

Cornwall G.A. *New insights into epididymal biology and function.* Human Reproduction Update. 2009; 15(2): 213-227.

Creinin M. et Keith L.G. *Spermicides.* Fertility Control (2nd edition). Éditeurs: Stephen L. Corson, Richard J. Derman, Louise B. Tyrer, 1994: 237-246.

de Krester D.M. *Endocrinology of the Male Reproductive System.* Chapter 1, 2007, Endotext.com

Duran E.H., Morshedi M., Taylor S., Oehninger S. *Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study.* Human Reproduction. 2002; 17: 3122-3128.

Eddy E.M. *Male Germ Cell Gene Expression.* Recent progress in hormone research. 2002; 57: 103-128.

Evenson D.P., Darzynkiewicz Z., Melamed M.R. *Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility.* Science. 1980; 210(4474): 1131-1133.

Evenson D.P., Jost L.K., Marshall D., Zinaman M.J., Clegg E., Purvis K., de Angelis P. Claussen O.P. *Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic.* Human Reproduction. 1999; 14(4): 1039-1049.

Evenson D.P., Larson K.L., Jost L.K. *Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques*. Journal of Andrology. 2002; 23(1): 25-43.

Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z. *Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells*. Experimental Cell Research. 1993; 207: 202-205.

Gordon G.G., Altman K., Southren A.L., Rubin E., Lieber C.S. *Effect of alcohol (ethanol) administration on sex-hormone metabolism in normal men*. New England Journal of Medicine. 1976; 295(15): 793-797.

Gunby J., Bissonnette F., Librach C., Cowan L. *Assisted reproductive technologies (ART) in Canada: 2006 results from the Canadian ART Register*. Fertility and Sterility. 2009; Epub ahead of print.

Henkel R., Kierspel E., Stalf T., Mehnert C., Menkveld R., Tinneberg H.R., Schill W.B., Kruger T.F. *Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients*. Fertility and Sterility. 2005; 83(3): 635-642.

Hermo L. et Clermont Y. *How are germ cells produced and what factors control their production?* Handbook of Andrology. Éditeurs: Robaine B., Pryor J., Trasler J.. Allen Press. American Society of Andrology. 1995:13-15.

Hossain A.M., Rizk B., Behzadian A., Thorneycroft I.H. *Modified guanidinium thiocyanate method for human sperm DNA isolation*. Molecular Human Reproduction. 1997; 3: 953-956.

Hughes E.G., Fedorkow D.M., Daya S., Sagle M.A., Van de Koppel P., Collins J.A. *The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials*, Fertility and Sterility. 1992; 58(5) : 888-96.

Hughes C.M., Lewis S.E., McKelvey-Martin V.J., Thompson W. *A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men using a modified comet assay*. Molecular Human Reproduction. 1996; 2: 613-619.

Hughes E.G. et Giacomini M. *Funding in vitro fertilization treatment for persistent subfertility: the pain and the politics*. Fertility and Sterility. 2001; 76(3): 431-442.

Keel B.A. *Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors*. Fertility and Sterility. 2006; 85(1):128-134.

Kerr J.B., Loveland K.L., O'Bryan M.K., de Krester D.M. *The cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms*. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (3rd edition). Éditeur: Jimmy D Neill. Elsevier, 2006 : 827-948.

Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S.H., Lombard C.V., van der Merve J.P. van Zyl J.A., Smith K. *Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization*. Fertility and Sterility. 1986; 46: 1118-1123.

Kunzle R., Mueller M.D., Hanggi W., Birkhäuser M.H., Drescher H., Bersinger N.A. *Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples*. Fertility and Sterility. 2003; 79(2): 287-291.

Laforest G., Sergerie M., Bleau G. *Innocuity of tetradecyl-dimethyl-benzyl ammonium fluoride on the DNA of human spermatozoa*. Contraception. 2004; 69: 425-432.

Lee C.H. *Review: In Vitro Spermicidal Tests*. *Contraception*. 1996; 54: 131-147.

Lewis S.E.M., Agbaje I., Alvarez J. *Sperm DNA Tests as Useful Adjuncts to Semen Analysis*. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2008; 54:111-125.

Liu P.Y. et Handelsman D.J. *The present and future state of hormonal treatment for male infertility*. *Human Reproduction Update*. 2003; 9(1): 9-23.

Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. *Molecular Cell Biology*, (4th edition). Éditeur: W.H. Freeman; 1999: 819.

Makker K., Agarwal A., Sharma R. *Oxidative stress and male infertility*. *The Indian Journal of Medical Research*. 2009; 129(4): 357-367.

Manicardi G.C., Bianchi P.G., Pantano S., Azzoni P., Bizzaro D., Bianchi U. and Sakkas D. *Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility*. *Biology of Reproduction*. 1995; 52: 864-867.

McPherson S.M.G. et Longo F.J. *Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids*. *Molecular Reproduction and Development*. 1992; 31: 268-279.

McPherson S.M.G. et Longo F.J. *Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids*. *European Journal of Histopathology*. 1993; 37: 109-128.

Menkveld R., Stander F.S., Kotze T.J., Kruger T.F., van Zyl J.A., *The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria*. *Human Reproduction*. 1990;5:586-592.

Nagata S. *Apoptosis by death factor*. Cell. 1997; 88: 355-365.

O'Flynn O'Brien K.L., Varghese A.C., Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: A review. Fertility and Sterility. 2010; 93: 1-12.

Oliva R. *Protamines and male infertility*. Human Reproduction Update. 2006; 12 (4): 417-435.

Olivennes F., Fanchin R., Bouchard P., Taïeb J., Selva J., Frydman R. *Scheduled administration of a gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix) on day 8 of in-vitro fertilization cycles: a pilot study*. Hum Reproduction. 1995; 10(6):1382-6.

Omoto C.K., Gibbons I.R., Kamiya R., Shingyoji C., Takahashi K., Witman G.B. *Rotation of the Central Pair Microtubules in Eukaryotic Flagella*. Molecular Biology of the Cell. 1999; 10: 1-4.

Pathak S., Kedia-Mokashi N., Saxena M., D'Souza R., Maitra A., Parte P., Gill-Sharma M., Balasinar N. *Effect of tamoxifen treatment on global and insulin-like growth factor 2-H19 locus-specific DNA methylation in rat spermatozoa and its association with embryo loss*. Fertility Sterility. 2009; 1(5 Suppl): 2253-63.

Paul C., Murray A.A., Spears N., Saunders P.T. *A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice*. Reproduction. 2008; 136: 73-84.

Quang Nhuan T. *À propos de l'exploration de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique*. Immuno-analyse & Biologie spécialisée. 2003; 18: 35-40.

Ren J.C., Banan A., Keshavarzian A., Zhu Q., LaPaglia N., McNulty J., Emanuele N.V., Emanuele M.A. *Exposure to ethanol induces oxidative damage in the pituitary gland.* Alcohol. 2005; 35: 91-101.

Rousseau S., Caron C., Govin J., Lestrat C., Faure A.-K., Khochbin S. *Establishment of male-specific epigenetic information.* Gene. 2005; 345: 139-153.

Saleh R.A., Agarwal A., Nelson D.R., Nada E.A., El-Tonsy M.H., Alvarez J.G., Thomas A.J. Jr, Sharma R.K. *Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study.* Fertility Sterility. 2002; 78(2): 313-318.

Sergerie M., Bleau G., Teulé R., Daudin M., Bujan L. *Intégrité de l'ADN des spermatozoïdes comme élément diagnostique et pronostique de la fertilité masculine.* Gynécologie Obstétrique & Fertilité. 2005; 33: 89-101.

Sinha Hikim A.P. and Swerdloff R.S. *Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis.* Reviews of Reproduction. 1999; 4: 38-47.

Spano M., Bonde J.P., Hjollund H.I., Kolstad H.A., Cordelli E., Leter G. *Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team.* Fertility Sterility. 2000; 73(1): 43-50.

Statistiques Canada. www.statcan.gc.ca

Tersarík J., Kopecný V., Plachot M., Mandelbaum J. *Early morphological signs of embryonic genome expression in human preimplantation development as revealed by quantitative electron microscopy.* Developmental Biology. 1988; 128(1):15-20.

Thakkar J.K., East J., Franson R.C. *Modulation of phospholipase A2 activity associated with human sperm membranes by divalent cations and calcium antagonists*. *Biology of Reproduction*. 1984; 30(3): 679-686.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. *The clinical utility of sperm DNA integrity testing*. *Fertility Sterility*. 2008; 90: S178-80.

Van Waart J., Kruger T.F., Lombard C.J., Ombelet W. *Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review*. *Human Reproduction Update*. 2001; 7(5): 495-500.

Van der Merwe F.H., Kruger T.F., Oehninger S.C., Lombard C.J. *The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population*. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2005; 59(2): 86-91.

Volg A.W. *Changes in the distribution of microtubules in rat Sertoli cells during spermatogenesis*. *The Anatomical Record*. 1988; 222: 34-41.

Ward W.S. et Coffey D.S. *DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cells*. *Biology of Reproduction*. 1991; 44: 569-574.

Ward W.S. *Deoxyribonucleic Acid Loop Domain Tertiary Structure in Mammalian Spermatozoa*. *Biology of Reproduction*. 1993; 48: 1193-1201.

Weber R.F., Dohle G.R., Romijn J.C. *Clinical laboratory evaluation of male subfertility*. *Advances in clinical chemistry*. 2005; 40: 317-64.

World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, (4th edition). Cambridge University Press. Angleterre, 1999.

Xu G. et Shi Y. *Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis*. Cell Research. 2007; 17:759-771.

Young B. et Heath J.W. *Histologie fonctionnelle*. (4^{ième} édition), Éditeur: Weather P.R., DeBoeck Université, 2001:330.

Zini A., Bielecki R., Phang D., Zenzes M.T. *Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men*. Fertility and Sterility. 2001; 75(4): 674-677.

Zini A., Phillips S., Courchesne A., Boman J.M., Baazeem A., Bissonnette F., Kadoch I.J., San Gabriel M. *Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay*. Fertility and Sterility. 2009; 91(6): 2495–2500.

Zini A. et Sigman M. *Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons*. Journal of Andrology. 2009; 30(3): 219-29.