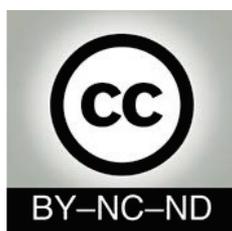




<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD -
LYON 1**

**FACULTE DE MEDECINE ET DE MAIEUTIQUE LYON-
SUD CHARLES MERIEUX**

Année 2019

N° 301

**Impact de la varicocèle sur les caractères et la
qualité du noyau spermatiques : étude
préliminaire.**

Thèse

Présentée à l'Université Claude Bernard -Lyon 1

et soutenue publiquement le 23 octobre 2019

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Mr BOSQUET Dorian

Né le 8 juin 1991

à Montélimar (26)

JURY

M. le Président : Hervé LEJEUNE, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

M. Jean-François GUERIN, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Mme Christine VINCIGUERRA, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

M. le Directeur : Mehdi BENCHAIB, Maitre de conférences des universités – Praticien
Hospitalier

Mme Jacqueline LORNAGE, Maitre de conférences des universités – Praticien Hospitalier

Mme Sylviane HENNEBICQ (invitée), Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

ADHAM Mustapha	Chirurgie Digestive
BONNEFOY Marc	Médecine Interne, option Gériatrie
BERGERET Alain	Médecine et Santé du Travail
BROUSSOLLE Emmanuel	Neurologie
BURILLON-LEYNAUD Carole	Ophthalmologie
CHIDIAC Christian	Maladies infectieuses ; Tropicales
FLOURIE Bernard	Gastroentérologie ; Hépatologie
FOUQUE Denis	Néphrologie
GEORGIEFF Nicolas	Pédopsychiatrie
GILLY François-Noël	Chirurgie générale
GLEHEN Olivier	Chirurgie Générale
GOLFIER François	Gynécologie Obstétrique ; gynécologie médicale
GUEUGNIAUD Pierre-Yves	Anesthésiologie et Réanimation urgence
LAVILLE Martine	Nutrition - Endocrinologie
LAVILLE Maurice	Thérapeutique - Néphrologie
LINA Gérard	Bactériologie
MALICIER Daniel	Médecine Légale et Droit de la santé
MION François	Physiologie
MORNEX Françoise	Cancérologie ; Radiothérapie
MOURIQUAND Pierre	Chirurgie infantile
NICOLAS Jean-François	Immunologie
PIRIOU Vincent	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
RODRIGUEZ-LAFRASSE Claire	Biochimie et Biologie moléculaire
SALLES Gilles	Hématologie ; Transfusion
SIMON Chantal	Nutrition
THIVOLET Charles	Endocrinologie et Maladies métaboliques
THOMAS Luc	Dermato –Vénérologie
TRILLET-LENOIR Véronique	Cancérologie ; Radiothérapie
VALETTE Pierre Jean	Radiologie et imagerie médicale
VIGHETTO Alain	Neurologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS (1ère Classe)

ALLAOUCHICHE Bernard	Anesthésie-Réanimation Urgence
ANDRE Patrice	Bactériologie – Virologie
BERARD Frédéric	Immunologie
BONNEFOY- CUDRAZ Eric	Cardiologie
BOULETREAU Pierre	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
CERUSE Philippe	O.R.L
CHAPET Olivier	Cancérologie, radiothérapie
DES PORTES DE LA FOSSE Vincent	Pédiatrie
DORET Muriel	Gynécologie-Obstétrique ; gynécologie médicale
FARHAT Fadi	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
FESSY Michel-Henri	Anatomie – Chirurgie Ortho
FEUGIER Patrick	Chirurgie Vasculaire
FRANCK Nicolas	Psychiatrie Adultes
FREYER Gilles	Cancérologie ; Radiothérapie
GIAMMARILE Francesco	Biophysique et Médecine nucléaire
JOUANNEAU Emmanuel	Neurochirurgie
KASSAI KOUPAI Behrouz	Pharmacologie Fondamentale, Clinique
LANTELME Pierre	Cardiologie
LEBECQUE Serge	Biologie Cellulaire
LIFANTE Jean-Christophe	Chirurgie Générale
LONG Anne	Médecine vasculaire
LUAUTE Jacques	Médecine physique et Réadaptation
PAPAREL Philippe	Urologie
PEYRON François	Parasitologie et Mycologie
PICAUD Jean-Charles	Pédiatrie
POUTEIL-NOBLE Claire	Néphrologie
PRACROS J. Pierre	Radiologie et Imagerie médicale
RIOUFFOL Gilles	Cardiologie
RUFFION Alain	Urologie

SALLE Bruno	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
SANLAVILLE Damien	Génétique
SAURIN Jean-Christophe	Hépatogastroentérologie
SERVIEN Elvire	Chirurgie Orthopédique
SEVE Pascal	Médecine Interne, Gériatrique
THOBOIS Stéphane	Neurologie
TRONC François	Chirurgie thoracique et cardio

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS (2ème Classe)

BARREY Cédric	Neurochirurgie
BELOT Alexandre	Pédiatrie
BOHE Julien	Réanimation urgence
BREVET-QUINZIN Marie	Anatomie et cytologie pathologiques
CHO Tae-hee	Neurologie
CHOTEL Franck	Chirurgie Infantile
COTTE Eddy	Chirurgie générale
COURAND Pierre-Yves	Cardiologie
COURAUD Sébastien	Pneumologie
DALLE Stéphane	Dermatologie
DEVOUASSOUX Gilles	Pneumologie
DISSE Emmanuel	Endocrinologie diabète et maladies métaboliques
DUPUIS Olivier	Gynécologie-Obstétrique ; gynécologie médicale
FRANCO Patricia	Physiologie - Pédiatrie
GHESQUIERES Hervé	Hématologie
GILLET Pierre-Germain	Biologie Cellulaire
HAUMONT Thierry	Chirurgie Infantile
LASSET Christine	Epidémiologie., éco. Santé
LEGA Jean-Christophe	Thérapeutique – Médecine Interne
LEGER FALANDRY Claire	Médecine interne, gériatrie
LUSTIG Sébastien	Chirurgie. Orthopédique,
MOJALLAL Alain-Ali	Chirurgie. Plastique.,
NANCEY Stéphane	Gastro Entérologie

PASSOT Guillaume	Chirurgie Générale
PIALAT Jean-Baptiste	Radiologie et Imagerie médicale
REIX Philippe	Pédiatrie -
ROUSSET Pascal	Radiologie imagerie médicale
TAZAROURTE Karim	Médecine Urgence
THAI-VAN Hung	Physiologies - ORL
TRAVERSE-GLEHEN Alexandra	Anatomie et cytologie pathologiques
TRINGALI Stéphane	O.R.L.
VOLA Marco	Chirurgie thoracique cardiologie vasculaire
WALLON Martine	Parasitologie mycologie
WALTER Thomas	Gastroentérologie – Hépatologie
YOU Benoît	Cancérologie

PROFESSEUR ASSOCIE sur Contingent National

PIERRE Bernard	Cardiologie
----------------	-------------

PROFESSEURS - MEDECINE GENERALE (2^{ème} Classe)

BOUSSAGEON Rémy
ERPELDINGER Sylvie

PROFESSEUR ASSOCIE - MEDECINE GENERALE

DUPRAZ Christian
PERDRIX Corinne

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS (Hors Classe)

ARDAIL Dominique	Biochimie et Biologie moléculaire
CALLET-BAUCHU Evelyne	Hématologie ; Transfusion
DIJOURD Frédérique	Anatomie et Cytologie pathologiques
LORNAGE-SANTAMARIA Jacqueline	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
MASSIGNON Denis	Hématologie – Transfusion
RABODONIRINA Meja	Parasitologie et Mycologie
VAN GANSE Eric	Pharmacologie Fondamentale, Clinique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS (1ère Classe)

BRUNEL SCHOLTES Caroline	Bactériologie virologie ; Hygiène .hospitalière.
COURY LUCAS Fabienne	Rhumatologie
DECAUSSIN-PETRUCCI Myriam	Anatomie et cytologie pathologiques
DESESTRET Virginie	Cytologie – Histologie
FRIGGERI Arnaud	Anesthésiologie
DUMITRESCU BORNE Oana	Bactériologie Virologie
GISCARD D’ESTAING Sandrine	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
LOPEZ Jonathan	Biochimie Biologie Moléculaire
MAUDUIT Claire	Cytologie – Histologie
MILLAT Gilles	Biochimie et Biologie moléculaire
PERROT Xavier	Physiologie - Neurologie
PONCET Delphine	Biochimie, Biologie cellulaire
RASIGADE Jean-Philippe	Bactériologie – Virologie ; Hygiène hospitalière
NOSBAUM ép ROSSIGNOL Audrey	Immunologie
SUJOBERT Pierre	Hématologie - Transfusion
VALOUR Florent	Mal infect.
VUILLEROT Carole	Médecine Physique Réadaptation

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS (2ème Classe)

BOLZE Pierre-Adrien	Gynécologie Obstétrique
DEMILY Caroline	Psychiatrie Adultes
HALFON DOMENECH Carine	Pédiatrie
JAMILLOUX Yvan	Médecine Interne - Gériatrie
KOPPE Laetitia	Néphrologie
PETER DEREK	Physiologie - Neurologie
PUTOUX DETRE Audrey	Génétique
RAMIERE Christophe	Bactériologie-virologie
SKANJETI Andréa	Biophysique. Médecine nucléaire.
SUBTIL Fabien	Bio statistiques
VISTE Anthony	Anatomie

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES – MEDECINE GENERALE

SUPPER Irène

PROFESSEURS EMERITES

Les Professeurs émérites peuvent participer à des jurys de thèse ou d'habilitation. Ils ne peuvent pas être président du jury.

ANNAT Guy	Physiologie
BERLAND Michel	Gynécologie-Obstétrique ; gynécologie médicale
CAILLOT Jean Louis	Chirurgie générale
CARRET Jean-Paul	Chirurgie Orthopédique
ECOCHARD René	Bio-statistiques
FLANDROIS Jean-Pierre	Bactériologie – Virologie; Hygiène hospitalière
DUBOIS Jean-Pierre	Médecine générale
LLORCA Guy	Thérapeutique
MATILLON Yves	Epidémiologie, Economie Santé et Prévention
PACHECO Yves	Pneumologie
PEIX Jean-Louis	Chirurgie Générale
SAMARUT Jacques	Biochimie et Biologie moléculaire
TEBIB Jacques	Rhumatologie

Remerciements

Aux membres du jury

A Monsieur le Professeur Hervé Lejeune,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury. Vos axes de recherche ont fortement inspiré ce modeste travail. Vous m'avez partagé vos brillantes intuitions qui ont été indispensables, de la mise en place jusqu'à la conclusion de ce travail. Merci.

A Monsieur le Docteur Mehdi Benchaïb,

En tant que directeur de thèse, tu as toute ma gratitude pour le temps passé, la disponibilité, et surtout la pertinence de tes corrections. Tout ça avec le sourire et la bonne humeur, dans les hauts et les bas. Grâce à cette « liberté avec conditions » que tu as su me donner dans ce travail, cette aventure a été une grande expérience qui je l'espère me rendra un petit peu plus endurci dans l'exercice de ce métier. Amitiés.

A Monsieur le Professeur Jean-François Guerin,

C'est un honneur de compter dans ce jury un examinateur de votre envergure. Soyez assuré de mon profond respect.

A Madame le Professeur Christine Vinciguerra,

Vous me faites l'honneur de représenter la faculté de Pharmacie dans ce jury. C'est toujours un plaisir de partager ces moments solennels avec vous. Merci pour votre bienveillance.

A Madame le Professeur Sylviane Hennebicq,

Vous me faites la faveur de participer à mon jury de thèse en tant que membre invité. Vous m'avez accordé votre confiance en me permettant de faire mon dernier semestre dans votre équipe Grenobloise. Merci.

A Madame le Docteur Jacqueline Lornage,

Vous me faites le grand honneur de participer à ce jury de thèse. En tant que responsable du laboratoire, vous avez soutenu ma maquette de bout en bout. Je vous suis reconnaissant de m'avoir fait bénéficier de ce parcours de spécialisation en biologie de la reproduction. Grâce à votre soutien, j'ai la chance de pouvoir continuer dans cette voie et donner suite à cette formation initiale. J'ai beaucoup apprécié que vous ayez toujours un œil sur l'avancé de ce travail. Merci.

Remerciements

A ma famille

A ma mère, pour avoir sacrifié une partie de son existence et son métier pour Hugo et moi. Tu as su, dans la douceur, nous donner un cadre, une structure à laquelle nous pouvons nous rattacher. Nous savons d'où nous venons et pouvons maintenant faire nos propres choix sereinement. Tu as tout mon amour.

A mon père. Tu es mon exemple. Je suis si admiratif des convictions qui ont fait de toi un père et un médecin. Ce sont ces valeurs humaines, justes et honnêtes que je m'efforcerai d'appliquer le reste de ma vie, autant sur le plan personnel que professionnel. Tu as tout mon amour.

A Hugo, mon frère. A nous ; à l'entraînement, la tête baissée, rivée sur le compteur de notre vélo de route ; la tête dans les épaules, le souffle court, face au rythme insoutenable d'une compétition de cyclocross ; dans une descente à pic au guidon de notre vtt, le bassin derrière la selle, les deux mains crispées sur nos leviers de freins ; à ski, le ventre noué par le silence pesant, addictif généré par l'immensité des montagnes ; dans une paire de baskets à l'assaut de l'asphalte ou de la roche ; à notre inlassable quête de la sensation de glisse sur un skateboard, des rollers, des patins à glace ; derrière le volant de notre kart rouge et jaune ; les yeux fermés, dans le vacarme assourdissant de nos instruments de musique. Dans la pinède, les vignes, les lavandes, les pieds de tomates, l'odeur des truffes, le chant des cigales et les paysages de cartes postales où s'est déroulé notre enfance. J'ai vraiment l'impression que l'on a tout partagé ensemble. Au détail prêt que je sois le « chien fou » et toi « le coach ». Je suis si heureux que tu puisses te projeter dans l'avenir et être épanoui dans ta vie quotidienne. Tu as tout mon amour.

A Gabrielle, mon âme sœur. T'avoir rencontré est le tournant majeur de ma vie. Tu es la quintessence de la beauté de l'être (J'ai hâte que tu sois présidente de la république). Je vie chaque jour dans le bonheur et la sérénité, grâce à la simple idée de construire ma vie avec toi. Merci pour ce soutien indéfectible. Love.

Aux Bosquet.

A papi André, A feu mamie Jaqueline. Que de souvenirs d'enfance, gravé dans mon cœur. A cet héritage du terroir Provençal que vous m'avez inculqué. Je vous aime.

A mon oncle Jean-Jacques, A ma tante Sylvie. Sachez que je respecte au plus haut point l'implication viscérale que vous avez dans votre métier de médecin. Merci pour ce sens de la famille inébranlable.

A feu Papi Daniel et feu Mamie Georgette. Vous perdre m'a fait très mal, mais tous ces bons souvenirs en votre présence me soignent.

A mes cousins Valérien, Bérenger, Alexia. A mon petit cousin Charly et à ma petite cousine Beatrix. Je vous embrasse.

Aux Ackermann.

A papi André, A mamie Claude. Merci pour tout cet amour que vous m'avez offert, sans fioriture, avec autant de douceur que dans toutes les boites de Chamonix orange que vous m'avez fait manger. A cet héritage de la Creuse à l'Alsace en passant par l'Auvergne, qui fait partie de moi. Je vous aime.

A mes Amis

A Jean-Acier. Frérot, clairement tu le sais notre respect mutuel n'a pas de limite. On a beaucoup rêvé, étudié, précisé et même concrétisé quelques projets ensemble. J'espère que ce déménagement dans le nord va nous rapprocher un peu.

A tout le gang des p'tits frères à vélo dont une partie est membre du team « objectif Mont-Blanc 2019 ». Le triptyque de la mort Vincent-Alban-Bastien et les autres Mamat, Matthew, ce grand Georgy. Bon je crois qu'on a officiellement raté le coche pour aller au sommet cette année. Finalement on est peut-être plus en sécurité en bas, dans la vallée. On s'est quand même mis une bonne Transjurassienne dans les mirettes cette année, ce qui équivaut probablement à une formation survie de 25 ans chez les Navy SEALs. Heureusement aucun de nous n'a de doigt manquant pour l'instant ! Notre amitié me rend vraiment heureux. Vivement les autres projets !

Aux Gizz Disciples,

Une aventure de dingue ! Notre amitié me fait sourire jusqu'aux oreilles tellement elle est douce et agréable. Cette passion commune pour la « mélodie » (on va dire ça pour ne pas vexer Thibaut en disant que l'on est un groupe de « death métal harmonique underground à tendance rock biologique ») entretient ce feu ardent dont le seul but est de partager, divertir.... en faisant pas mal de bruit il faut bien l'avouer. Je sais je joue trop fort.

Mon Bastien. Tu le sais, je crois que l'on ne mesure pas encore à quel niveau on a des points communs.... La façon dont tu te mets à nu (au sens propre et figuré) sur scène, micro à la main, rend le groupe vivant, électrique. On te doit beaucoup pour la survie des Gizz, merci pour ton amitié.

Mon Thibaut. Sacrée rencontre. La basse. Savant mélange entre appui de la mélodie et soutien de la rythmique. Art que tu maîtrises sereinement dans un stoïcisme légendaire. Merci pour tout ce que tu apportes au groupe et tout ce que tu m'as apporté en tant que collègue et ami.

Mon Corentin. Le « Eric Gillette » de la biologie médicale. Tu claques des communications orales en anglais dans des congrès internationaux tout en apprenant par cœur des morceaux de batterie en 12/8 avec des passages en 7/4 introduisant un petit 6/8. Le tout récité avec ses doigts en tapant sur une table basse Ikea bancale. Sans rire, c'est bien agréable de jouer avec toi. Merci de ton amitié et merci de me communiquer cette passion pour le rock prog.

Un grand merci au SIPHL pour le prêt de la salle de répétition.

A mes co-internes Lyonnais.

Mention spéciale à mes camarades Loulou, Coco, Totole, Faustine, Flo le sicilien vietnamien, les innombrables Thibaut(s), Alex, Stéph, CamSex, Sarra&Sarah, au petit Grégory, Estelle et tous ceux que j'ai oublié de citer. On est arrivé bébé, c'est un plaisir d'avoir grandi avec vous. Malgré parfois le silence radio, je dois à certain de vous beaucoup dans l'avancé de mes études. Vous avez toute mes sincères amitiés.

A tous les jeunes internes de Biologie Médicale qui on suivit notre promo. J'ai apprécié travailler avec vous lors de ces longues heures de gardes... comme disais l'autre « du travail de fourmi, tapi dans l'ombre, participant à notre manière à la continuité des soins ».

A mes co-internes Grenoblois.

C'est quoi cette histoire de fou ? Je reste 6 mois chez vous et je pars des souvenirs pleins la tête. Quentin you're so french, Lucie, Lucie dépêche-toi, On vit, on ne meurt qu'une fois, Arthur et Aurélien vous êtes de gros dégueulasses, sans parler de ce bon vieux Lionel qui est je cite « chaud de night ». Une grosse bise à vous.

A mes co-internes de PMA,

Mention spéciale à Sarra qui m'a accompagnée et supportée pendant ce niveau 2. Merci Pauline, Camille.

Mon Nico, je t'apprécie beaucoup tu le sais. Un confident et surtout un vieux briscard toujours de bons conseils... et avec le mot pour rire qui va avec.

Aux copains du Master 2.

Que de rencontre à Paris. Nadia, Lina, Sophie et mon « associé » Arthur. Du pur bonheur.

Aux Biologistes et techniciens de laboratoire qui m'ont formé patiemment.

A l'équipe Lyonnaise, je vous dois tout. Votre niveau de compétence et de sérénité dans des tâches techniques, stressantes est impressionnant. Malgré l'énorme activité du labo vous avez toujours su prendre le temps pour moi. Merci.

A l'équipe Grenobloise. Vous m'avez accueilli à bras ouvert dans la bonne humeur. Y a toujours une place pour moi sous la paillasse si je veux me former. Merci.

Table des matières

I. GENERALITES	15
1. ANATOMIE ET HISTOLOGIE DU TESTICULE	15
2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA VARICOCELE	17
a. <i>Le plexus veineux spermatique antérieur dit « pampiniforme »</i>	17
b. <i>Etiologie</i>	18
c. <i>Epidémiologie</i>	19
d. <i>Clinique et classification</i>	19
e. <i>L'écho-doppler scrotal</i>	20
f. <i>Traitement</i>	20
g. <i>Influence de la varicocèle sur la fertilité masculine</i>	20
3. GRANDS AXES DU DEROULEMENT DE LA SPERMATOGENESE	22
a. <i>Phase de multiplication des cellules souches</i>	23
b. <i>Phase de croissance et maturation</i>	23
c. <i>Phase de différenciation cellulaire et spermiation</i>	24
d. <i>Trajet intra-testiculaire et maturation épидидymaire</i>	25
4. LES MODIFICATIONS DE LA CHROMATINE PENDANT LA SPERMIOGENESE ET LA MATURATION EPIDIDYMAIRE	26
a. <i>Modification post-traductionnelle des histones</i>	26
b. <i>Incorporation de variants d'histones</i>	26
c. <i>Le remplacement des histones par les protéines de transition, puis les protamines</i>	27
d. <i>Impact de la maturation épидидymaire sur la chromatine</i>	28
e. <i>Structure finale de la chromatine</i>	29
5. ORIGINES DES ANOMALIES DE MATURATION DE L'ADN SPERMATIQUE	29
a. <i>Défaut du remodelage de la chromatine spermatique et des mécanismes de réparation</i>	29
b. <i>Déséquilibre de l'homéostasie des substances réactives de l'oxygène (ROS)</i>	30
c. <i>Activité apoptotique anormale</i>	30
d. <i>Autres facteurs</i>	31
6. PROBLEMATIQUE DU TRAVAIL.....	32
II. MATERIEL ET METHODE	33
1. MISE EN PLACE DE L'ETUDE	33
a. <i>Choix du type d'étude</i>	33
b. <i>Proposition d'une structure d'étude</i>	33
c. <i>Critères d'inclusion et d'exclusion</i>	33
d. <i>Méthode d'analyse statistique</i>	34
2. TECHNIQUES D'ANALYSES DU SPERME UTILISEES	34
a. <i>Le spermogramme</i>	34
b. <i>Le Test de migration survie</i>	35
c. <i>Étude de la fragmentation de l'ADN spermatique par la technique TUNEL</i>	36
d. <i>Étude de la condensation de l'ADN spermatique par coloration au bleu d'aniline</i>	37
III. RESULTATS	38
1. DONNEES A L'INCLUSION	38
2. CARACTERISTIQUES SPERMATQUES DE LA COHORTE.....	39
3. CORRELATION ENTRE LE DFI ET SDI AVEC LES PARAMETRES SPERMATQUES	40
IV. DISCUSSION	43
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	47

Table des illustrations

<i>Figure 1 : Structure anatomique du testicule. (D'après Legoupil, 2013)</i>	15
<i>Figure 2: Coupe histologique d'un tube séminifère. (Image libre de droit, Ressources Web Unisciel)</i>	16
<i>Figure 3: Vascularisation du complexe épидидymo- testiculaire. (D'après Kamina, 2005)</i>	17
<i>Figure 4 : Physiopathologie de la varicocèle. (D'après Jensen et al., 2017)</i>	18
<i>Figure 5 : Reflux doppler avant et après manœuvre de Valsalva. (Source Web : http://www.ultrasound-images.com/scrotum.htm)</i>	20
<i>Figure 6: Impact de la varicocèle sur l'environnement testiculaire et la spermatogénèse. (D'après Roque et al., 2018)</i>	22
<i>Figure 7 : Schéma récapitulatif de l'évolution morphologique et chromosomique de la lignée germinale masculine. (Image libre de droits n°116875789 - Alila Medical Media)</i>	23
<i>Figure 8 : Structure tridimensionnelle de l'ADN spermatique versus somatique. (D'après Braun et al., 2001)</i>	29
<i>Figure 9: Homéostasie oxydo-réductionnelle au sein de l'épididyme.</i>	30
<i>Figure 10 : Facteurs environnementaux ayant un impact sur le taux de fragmentation de l'ADN spermatique. (D'après Muratori et al., 2019)</i>	31
<i>Figure 11 : aspect microscopique des spermatozoïdes après protocole TUNEL, à l'objectif x100. (D'après Khalili et al., 2014)</i>	36
<i>Figure 12: aspect microscopique des spermatozoïdes après coloration au bleu d'aniline à l'objectif x100. (D'après Kim et al., 2013)</i>	37
<i>Tableau 1 : Classification clinique de Dubin et Amelar (1970)</i>	19
<i>Tableau 2: Mode d'inclusion dans l'étude</i>	33
<i>Tableau 3 : Descriptif des données cliniques</i>	38
<i>Tableau 4 : Paramètres du spermogramme-spermocytogramme</i>	39
<i>Tableau 5 : Paramètres issus des tests de migration-survie</i>	40
<i>Tableau 6 : Corrélations entre le DFI et le SDI et les caractéristiques spermatiques.</i>	41
<i>Tableau 7 : Corrélations entre le DFI et le SDI et les résultats du TMS.</i>	42
<i>Tableau 8 : DFI et SDI en fonction de la gravité de la varicocèle (moyenne ± écart type)</i>	42

Abréviations

ABM : Agence de la biomédecine

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMP : Assistance médicale à la procréation

ARN : Acide ribonucléique

DFI : DNA fragmentation index

FIV : Fécondation in vitro

GPx : Glutathion peroxydases

IMC : Indice de masse corporelle

IVF : *In vitro* fertilization

NTMSI : Nombre de spermatozoïdes typiques mobiles dans l'inséminât

PCR : Polymerase chain reaction

ROS : Reactive oxygen species

SDI : Sperm decondensation index

SOD : Superoxide dismutase

TdT : Terminal désoxynucléotidyl transférase

TMS : Test de migration-survie

TUNEL : Terminal uridine nick end ligation

Introduction

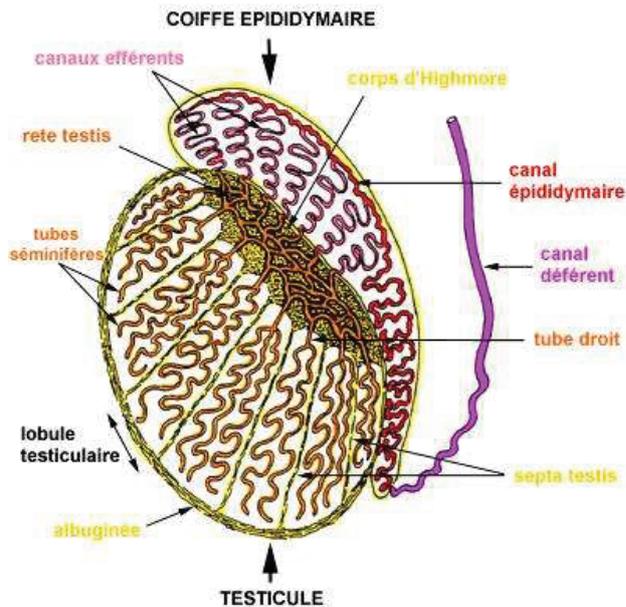
Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'hypofertilité est définie par l'absence de grossesse évolutive après au moins 12 mois de rapports sexuels non protégés. Face à cette hypofertilité, des solutions médicales peuvent être apportées aux couples. Elles consistent d'abord à identifier dans ces couples des causes curables d'hypofertilités, pour espérer obtenir une grossesse spontanée. En l'absence de traitement curatif, une prise en charge par technique d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) peut être proposée. Néanmoins, ces techniques ont des pourcentages de réussites de l'ordre de de 10 à 45%, suivant les techniques et l'âge de la femme (rapport d'activité Agence de la biomédecine, 2016). Le nombre de tentatives d'AMP à la charge de la sécurité sociale étant limité, il semblerait alors intéressant de les optimiser. Cette optimisation pourrait passer par l'amélioration des outils diagnostics permettant d'identifier des anomalies gamétiques, notamment masculines. En effet, les facteurs masculins seraient impliqués une fois sur deux dans l'infertilité du couple. Les causes principales sont des perturbations de la spermatogénèse et de la maturation épидидymaire, responsables d'anomalies en quantité et/ou en qualité des spermatozoïdes dans l'éjaculat. Selon Hassanin *et al.*, (2018), ces anomalies spermatiques pourraient être expliquées en partie par la présence d'une varicocèle. En effet, c'est l'élément clinique plus souvent retrouvé chez les hommes infertiles, environ une fois sur cinq. De plus, il semblerait que la varicocèle ait un impact négatif sur l'environnement testiculaire et donc sur le bon déroulement de la spermatogénèse, particulièrement sur la maturation chromatinienne des spermatozoïdes. L'intégrité génomique du spermatozoïde est indispensable pour la fécondation, le développement embryonnaire jusqu'à l'implantation embryonnaire. Notre projet est donc d'évaluer les paramètres spermatiques de routine et les marqueurs d'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes, dans une population de patients infertiles porteurs d'une varicocèle. Ces mesures seront réalisées avant et après embolisation de la varicocèle, afin de valider l'intérêt du traitement de la varicocèle. Ce travail de thèse va porter sur les paramètres initiaux des premiers patients inclus, et permettra de valider la méthodologie qui sera mise en œuvre pour la poursuite de l'étude.

Durant ce travail, nous définirons d'abord la varicocèle, tout en insistant sur la littérature récente mettant en rapport la varicocèle et l'hypofertilité masculine. Ensuite nous exposerons les grands axes de la spermatogénèse afin de placer dans le temps et l'espace les phases critiques de maturation chromatinienne. Ensuite nous définirons quelles sont les principales causes d'altération de l'ADN spermatique. Nous évaluerons dans quelle mesure les informations regroupées dans cette introduction se recoupent, pour justifier les défauts de maturité de l'ADN spermatique chez les porteurs de varicocèle. Ensuite, nous exposerons comment nous avons procédé pour mener à bien ce travail. Nous présenterons alors nos résultats et porterons une analyse critique sur ceux-ci en les comparant à ceux de la littérature. Enfin, nous proposerons un protocole d'étude afin que le projet puisse être continué.

I. Généralités

1. Anatomie et histologie du testicule

Figure 1 : Structure anatomique du testicule. (D'après Legoupil, 2013)



Au plan anatomique, le testicule est un organe pair de forme ovoïde et aplatie. Sa situation anatomique est singulière, puisqu'elle est extra corporelle afin de satisfaire aux contraintes thermiques nécessaires à la spermatogénèse. Comme nous pouvons le voir dans la figure 1, l'albuginée est la séreuse qui l'enveloppe et qui cloisonne le testicule en lobules, contenant les tubes séminifères. Le testicule mature contient environ 250 à 300 lobules, séparés par des cloisons fibreuses, contenant chacun 3 à 4 canalicules séminifères. À la suite de ceux-ci, le rete testis est issu d'un

épaississement de l'albuginée et permet *via* les canaux efférents d'orienter les spermatozoïdes, nouvellement libérés dans les canaux séminifères, en direction de l'épididyme. Celui-ci coiffe le testicule au niveau de son bord dorso-cranial : Il s'agit d'un tube pelotonné de 5 à 7 mètres de long séparé en 3 segments principaux : la tête, partie qui fait suite à la convergence des canaux efférents. Puis le corps, séparé du testicule par le sillon épидидymo-testiculaire, contenant la plus grande partie du canal épидидymaire. Et enfin la queue, accolée à la face externe du testicule et qui forme la partie distale du canal épидидymaire. Pour finir le canal déférent continue l'épididyme et permet le cheminement des spermatozoïdes vers les canaux éjaculateurs lors de l'émission des gamètes au moment de l'orgasme.

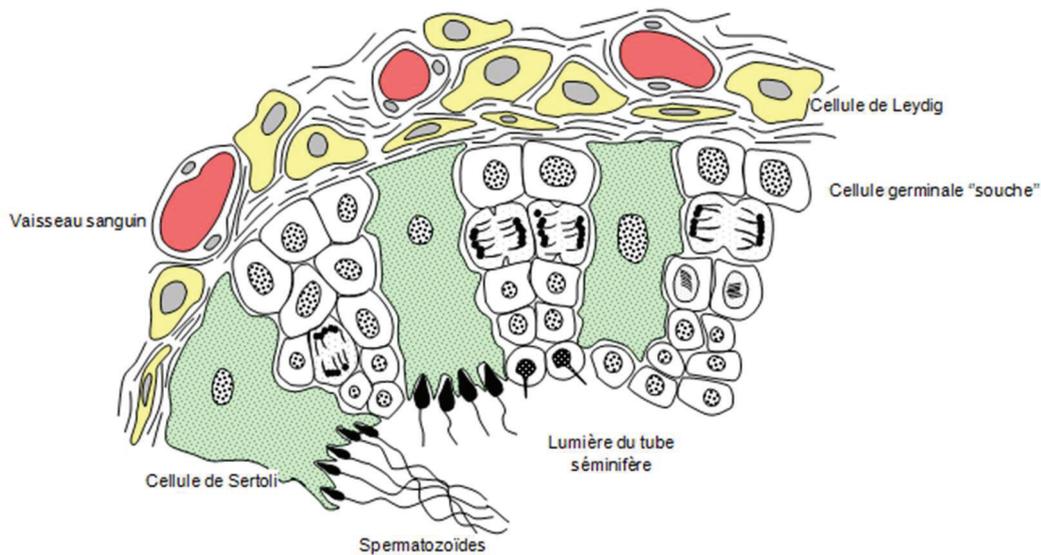
Au plan histologique, l'épithélium des tubes séminifères est constitué majoritairement par les cellules de Sertoli accompagnées de cellules de la lignée germinale (figure 2). L'épaisseur de l'épithélium des tubes séminifères est délimitée en deux compartiments : un compartiment basal, qui correspond à la portion de l'épithélium située à proximité de la membrane basale, et un compartiment adluminal, qui correspond à la région de l'épithélium située à proximité de la lumière du tube séminifère. Les cellules germinales s'organisent en syncytium au même stade de développement mais adoptent une conformation en spirale formant un aspect hétérogène lors d'un examen d'une coupe histologique de testicule (figure 2).

Les cellules de Sertoli, ont pour rôle :

- de former une barrière hémato-testiculaire, évitant le contact des cellules germinales, avec les cellules du système immunitaire.
- d'interagir avec les spermatozoïdes, particulièrement lors de la spermatogénèse.
- de participer à la régulation hormonale de la spermatogénèse.

Entre les tubes séminifères se trouve un tissu conjonctif, très vascularisé, où se trouve les cellules de Leydig. Ces cellules représentent la fonction endocrine du testicule.

Figure 2: Coupe histologique d'un tube séminifère. (Image libre de droit, Ressources Web Unisciel)



2. Physiopathologie de la Varicocèle

La varicocèle est fréquemment retrouvée lors d'une infertilité. Elle serait une des causes d'altération de la qualité du noyau spermatique. Il convient donc de décrire cette pathologie et dans quelle mesure elle peut avoir un impact direct sur le bon déroulement de la spermatogénèse.

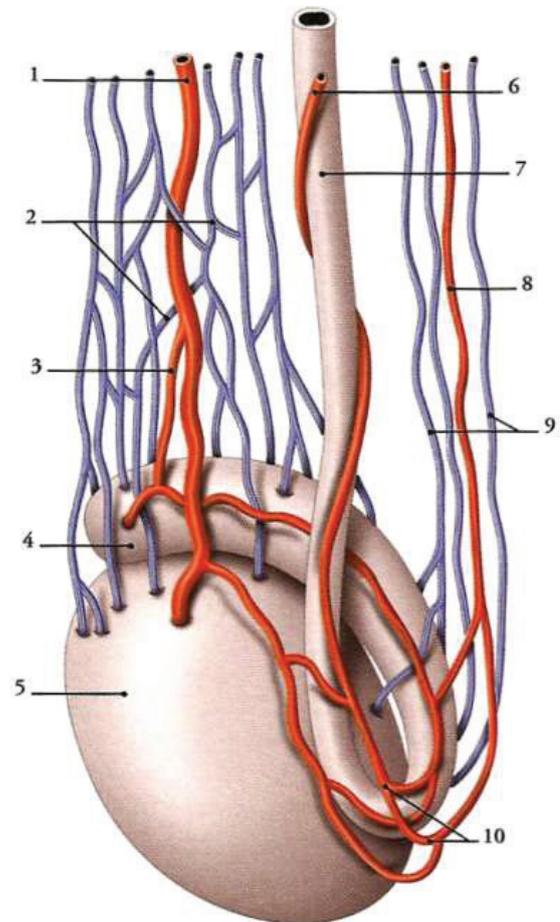
a. Le plexus veineux spermatique antérieur dit *pampiniforme*

Le système veineux testiculaire correspond aux veines qui drainent le sang des testicules.

Son trajet est particulièrement long, caractérisé par une terminaison différente à droite (directement dans la veine cave inférieur) par rapport à la terminaison à gauche (directement dans la veine rénale gauche).

Les veines testiculaires ont une origine profonde dans le testicule. Elles prennent naissance dès les cloisons inter-lobulaires. Elles émergent ensuite au niveau du pôle supérieur du testicule. La quasi-totalité des veines du testicule, de la tête et du corps de l'épididyme s'anastomosent, formant un faisceau (figure 3). Celui-ci est qualifié de *pampiniforme*, issu d'un nom latin évoquant un cep de vigne. Il est d'abord en rapport avec l'épididyme puis, en remontant, avec le canal déférent et les artères testiculaires, dans la loge antérieure du cordon spermatique (figure n°3). Cette organisation en faisceau permettrait de faciliter les échanges de chaleur afin de faire baisser la température intra testiculaire, en addition à la localisation extra corporelle du testicule.

Figure 3: Vascularisation du complexe épидидymo- testiculaire. (D'après Kamina, 2005)



Veines et artères du testicule et de l'épididyme

- | | |
|---------------------------|---------------------------------------|
| 1. a. testiculaire | 7. conduit déférent |
| 2. plexus pampiniforme | 8. a. crémastérique |
| 3. a. épидидymaire unique | 9. v. de la queue de l'épididyme |
| 4. épидidyme | 10. anastomoses artérielles multiples |
| 5. testicule | |
| 6. a. du conduit déférent | |

Comme nous pouvons le voir sur la figure 3, il existe également un réseau veineux postérieur se drainant dans la veine épigastrique qui n'est pas concerné par la pathologie variqueuse.

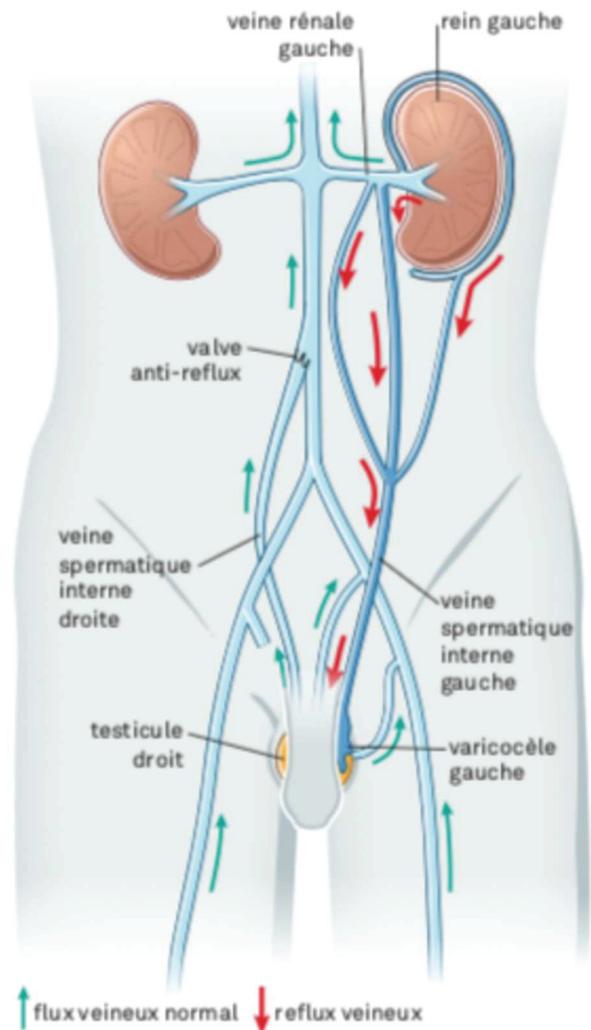
b. Etiologie

La varicocèle est définie par une dilatation des veines du plexus *pampiniforme*, conséquence d'une stase veineuse. Celle-ci est causée par une incontinence valvulaire du réseau veineux testiculaire, entraînant une inversion du gradient de pression sanguine (figure 4) normalement présent entre la veine cave inférieure/veines rénales (où la pression est minimale) et les veines testiculaires (où la pression est élevée). Ce dysfonctionnement est retrouvé dans 80% des cas du côté gauche. En effet, la veine testiculaire gauche a la particularité de se drainer dans la veine rénale gauche, de plus petit diamètre par rapport à la veine cave inférieure. De plus la veine testiculaire gauche s'abouche quasiment perpendiculairement à la veine rénale gauche *via* un trajet beaucoup plus tortueux à gauche qu'à droite (du à la proximité avec le colon gauche).

Les causes de ces anomalies valvulaires ne sont pas encore totalement expliquées. En effet, il existe des discordances entre la fréquence de l'incontinence valvulaire du réseau veineux testiculaire et l'incidence de la varicocèle, dans la population générale. Chez certains patients il pourrait y avoir une cause organique héréditaire : l'avalvulie congénitale du réseau veineux testiculaire. En effet, selon Gökçe *et al.*, (2010) le risque d'avoir un diagnostic clinique de varicocèle est 3 fois plus important lorsqu'un parent au premier degré a eu un diagnostic de varicocèle au même âge. De plus ces varicocèles seraient de gravité supérieure par rapport au groupe contrôle. Chez d'autres patients, la cause pourrait être acquise : l'appauvrissement valvulaire progressif, dû à une exposition à des métabolites toxiques d'origine rénale et surrénale. Ces étiologies semblent aggravées par la faible concentration constitutionnelle en valvules au niveau du réseau veineux testiculaire par rapport au reste du réseau veineux.

Nous décrivons dans cette thèse la varicocèle primaire (dites « idiopathique »), la varicocèle secondaire étant due à une compression directe ou à une obstruction (tumorale, thrombotique) du réseau veineux. Celle-ci est beaucoup plus rare.

Figure 4 : Physiopathologie de la varicocèle. (D'après Jensen *et al.*, 2017)



c. Epidémiologie

La varicocèle apparaîtrait dès l'adolescence (Dobanovacki *et al.*, 2010) puisque son incidence est déjà d'environ de 16%, comparée à la population adulte où l'incidence est de 15 à 20%. Selon l'étude de Alsaikhan *et al.*, (2016) dans la population hypofertile, le taux de patients porteurs d'une varicocèle est significativement plus élevé que dans la population générale, de l'ordre de 25 à 35 %. De plus, une varicocèle est retrouvée chez près de 80% des hommes consultant pour un problème d'hypofertilité secondaire et chez 35% des hommes consultant pour un problème d'hypofertilité primaire. La présence d'une varicocèle serait corrélée positivement à l'âge (Alsaikhan *et al.*, 2016). Environ un quart des ces patients auraient des altérations spermatiques.

d. Clinique et classification

L'examen clinique masculin n'est pas réalisé en première intention lorsqu'un couple présente une hypofertilité. En effet, il existe deux grandes circonstances de découverte de la varicocèle:

- la présence d'une symptomatologie fonctionnelle, reflet de la stase veineuse à type de douleur, ou de pesanteur plutôt nocturne d'une bourse, accompagnée d'un gonflement aigue ou chronique de celle-ci.

- lors d'un bilan d'hypofertilité avec, le plus souvent, une altération des paramètres spermatiques.

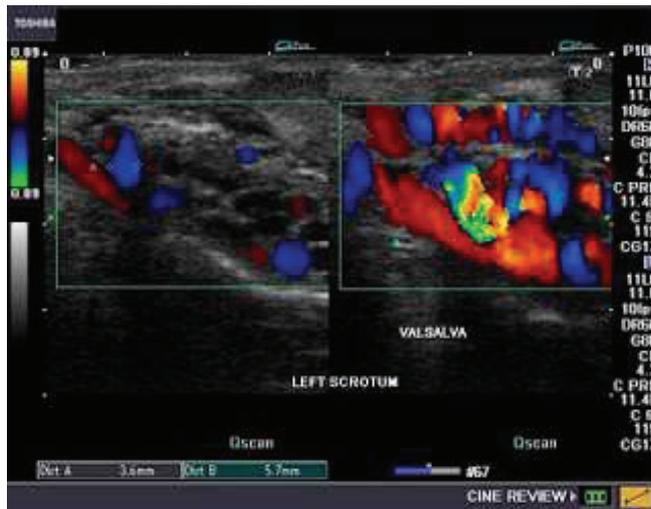
L'examen clinique est bilatéral et débute par la position debout : à l'observation la varicocèle a un aspect pelotonné, coiffant le testicule. A la palpation l'opérateur identifie une masse de veines dilatées et tortueuses, dépressibles et souples. En position allongée, la varicocèle est le plus souvent non visible. La manœuvre de Valsalva permet, grâce à un effort bloqué d'expiration forcée, de dilater le réseau veineux et ainsi mettre en évidence la varicocèle. Lors de l'examen clinique, le volume testiculaire est calculé grâce à un orchidomètre. La varicocèle droite est moins évidente et plus difficile à dépister. La varicocèle peut être bilatérale. D'après Hassanin *et al.*, (2018), l'examen clinique à une spécificité de 100%, mais une sensibilité de 66%, appuyant l'intérêt d'un examen para-clinique supplémentaire. La classification clinique de Dubin et Amelar (Dubin *et al.*, 1970) pour la varicocèle est la plus utilisée pour évaluer la gravité clinique de la pathologie (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification clinique de Dubin et Amelar (1970)

Grade	Définition
stade 0	varicocèle infra-clinique dépistée par échographie scrotale
stade 1	varicocèle non visible et palpable uniquement à la manœuvre de Valsalva
stade 2	varicocèle non visible mais palpable sans manœuvre de Valsalva
stade 3	varicocèle visible à l'œil nu

e. L'écho-doppler scrotal

Figure 5 : Reflux doppler avant et après manœuvre de Valsalva.
(Source Web : <http://www.ultrasound-images.com/scrotum.htm>)



La varicocèle apparaît à l'échographie en arrière du testicule, près de l'épididyme, sous la forme d'une image alvéolée. Cet aspect est dû à un réseau hypoéchogène représentant les vaisseaux, contrasté par le caractère anéchogène du sang veineux. Tout comme l'examen clinique cet examen est réalisé debout, puis allongé et avec la manœuvre de Valsalva (figure n°5). Le volume testiculaire est mesuré afin de déterminer l'existence d'une atrophie testiculaire. Le volume est

comparé à l'estimation obtenue lors de l'examen clinique et au bilan hormonal du patient. Les index dopplériques permettent d'évaluer la gravité du reflux et sa durée pendant la manœuvre de Valsalva. L'écho-doppler permet également d'éliminer une cause secondaire compressive. Cet examen paraclinique est complémentaire de la clinique et permet d'affirmer ou d'infirmer la nécessité du traitement de la varicocèle.

f. Traitement

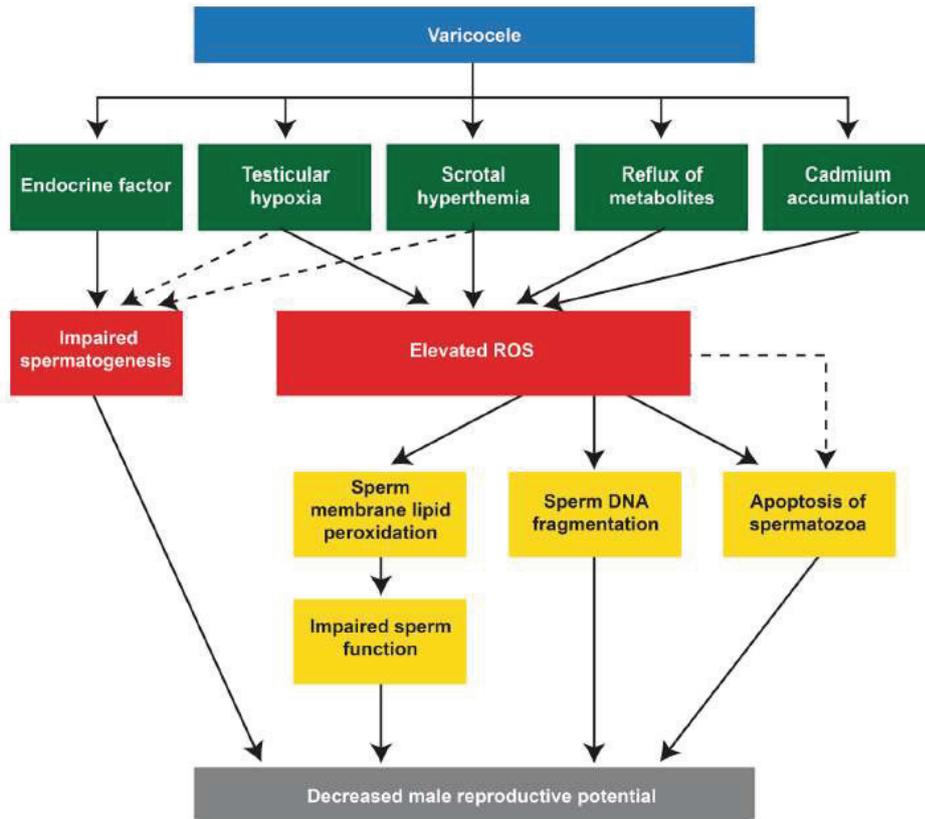
Il existe des solutions thérapeutiques purement chirurgicales où les veines testiculaires sont directement ligaturées. En opposition il existe des techniques moins invasives, la veine testiculaire va être embolisée grâce à une technique de radiologie interventionnelle. Toute technique confondue, le traitement serait efficace dans 90 à 99% (Schlegel *et al.*, 2004). Le risque de récurrence restant faible, de 2 à 8% suivant les sources (Sepúlveda *et al.*, 2018). La société française d'urologie propose des critères d'éligibilité au traitement (recommandations de 2007) : la varicocèle doit être cliniquement palpable, l'infertilité du couple doit être documentée, il n'existe pas de problème d'infertilité féminine ou celle-ci peut être traitée, il existe au moins une anomalie des paramètres spermatiques au spermogramme.

g. Influence de la varicocèle sur la fertilité masculine

Selon Garolla *et al.*, (2015), il existerait une hyperthermie scrotale chez les porteurs de varicocèle, avec une augmentation de la température scrotale de l'ordre de 2,6 °C. La stase veineuse provoquée par la varicocèle entraînerait l'accumulation de métabolites testiculaires toxiques issus du métabolisme de la testostérone (Hassanin *et al.*, 2018). Cette stase piégerait également des leucocytes normalement éliminés. Ces leucocytes sont vecteurs de stress oxydant. L'insuffisance valvulaire entraînerait un reflux de métabolites toxiques d'origine rénale

ou surrénalienne (catécholamines, sérotonines, prostaglandines). Ces métabolites toxiques aggraveraient l'appauvrissement en valvules de la veine testiculaire et seraient responsables de vasospasmes entraînant une grave hypoxie tissulaire (Ghandehari-alavijeh *et al.*, 2019) : atteinte de la microcirculation, anomalies de contraction des canaux déférents, défaut de la barrière hémato-testiculaire. Cette atteinte de la microcirculation aurait aussi un impact important sur l'épididyme du fait de sa faible vascularisation physiologique (Koksal *et al.*, 2007). Selon ce même auteur, c'est l'environnement testiculaire hypoxique qui serait la voie principale des défauts spermatiques, se traduisant par une atteinte de la chromatine des spermatozoïdes. Ces altérations entraîneraient un défaut de régulation du métabolisme oxydatif au sein de l'épididyme. Un des effets de ces altérations, serait une chute de la concentration en zinc, plus particulièrement chez les patients ayant une varicocèle de haut grade clinique (Nguyen *et al.*, 2019). Le zinc est un protecteur anti-oxydant qui permet également de lutter contre les métaux toxiques comme le cadmium. D'ailleurs, la porosité au niveau de la barrière hémato-testiculaire favoriserait l'exposition des spermatozoïdes à cet élément métallique, induisant l'apoptose de ceux-ci (Benoff *et al.*, 2000). L'analyse protéomique du plasma séminal des patients porteurs d'une varicocèle est significativement différente de celle d'un patient indemne de varicocèle, particulièrement au niveau de régulateur du stress oxydatif, et des facteurs de peroxydation lipidique (Panner *et al.*, 2018). Ces modifications de l'environnement épидидymaire auraient un impact sur les altérations de l'ADN des spermatozoïdes : augmentation de la fragmentation, défaut de méthylation, et réduction de la longueur télomérique des chromosomes spermatiques, qui ont un rôle majeur dans l'intégrité du génome (Santana *et al.*, 2019). Dans le même temps, la varicocèle serait à l'origine d'une perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysaire secondaire aux désordres hormonaux par insuffisance testiculaire primitive (Guercio *et al.*, 2018). Ces déficits hormonaux, notamment de la testostérone, ont un impact sur la spermatogénèse et peuvent expliquer une partie des anomalies des paramètres spermatiques. Pour appuyer ce propos, Guido *et al.*, (2011) a montré une baisse de l'expression des récepteurs androgéniques au sein de la membrane spermatique chez les patients porteurs d'une varicocèle. La figure n°6 résume les différents impacts de la varicocèle sur l'environnement testiculaire et sur la spermatogénèse.

Figure 6: Impact de la varicocèle sur l'environnement testiculaire et la spermatogénèse. (D'après Roque et al., 2018)

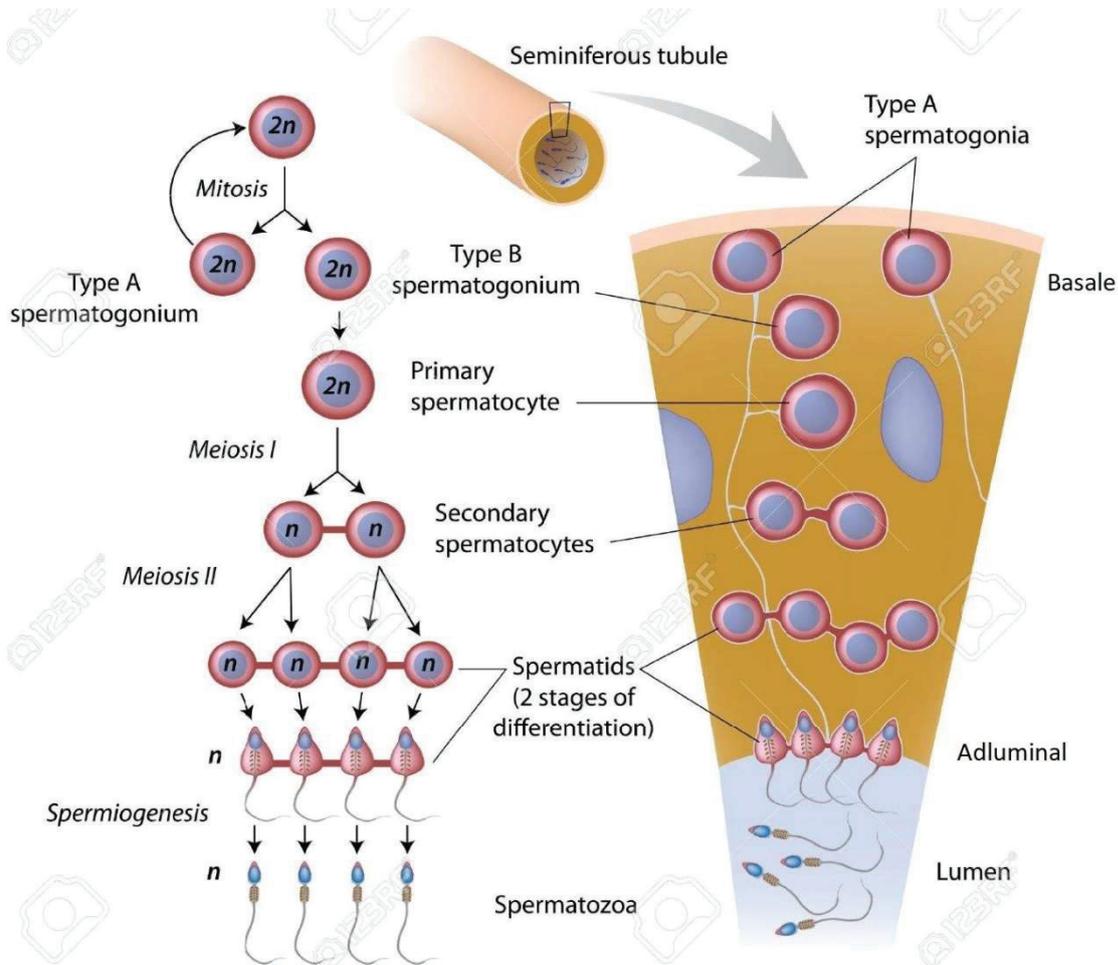


La varicocèle aurait donc un impact direct sur le bon déroulement de la spermatogénèse, et pourrait expliquer l'hypofertilité des patients qui en seraient porteurs. Pour autant, la varicocèle semble une pathologie complexe et multifactorielle dont les composantes génétiques et les facteurs environnementaux contribuent à l'évolution de la maladie.

3. Grands axes du déroulement de la spermatogénèse

La puberté marque le point de départ de la spermatogénèse. Ce processus englobe la totalité du développement, allant des spermatogonies jusqu'aux spermatozoïdes. Ces cycles de spermatogénèses durent environ 74 jours. La production de spermatozoïdes s'opère tout le long de la vie de l'homme, mais elle peut subir des dysfonctionnements avec l'âge. Cette spermatogénèse est constituée de 3 phases (figure n°7) : Phase de multiplication des cellules souches, phase de croissance et maturation, phase de différenciation cellulaire et spermiation.

Figure 7 : Schéma récapitulatif de l'évolution morphologique et chromosomique de la lignée germinale masculine. (Image libre de droits - Alila Medical Media)



a. Phase de multiplication des cellules souches

Les spermatogonies sont des cellules souches diploïdes (2 chromosomes et 2 chromatines) se situant à proximité de la membrane basale du tube séminifère. Il existe trois types de spermatogonies, qui se distinguent par l'aspect de leur chromatine : les spermatogonies Ad (considérées comme les cellules souches de la spermatogenèse) : elles peuvent rentrer en division par mitose s'il existe un déficit en aval, en se divisant en une autre spermatogonie Ad pour reconstituer le stock (division homonyme) ou en formant des spermatogonies Ap (division hétéronyme). Ensuite, ces spermatogonies Ap se divisent par mitose en spermatogonies de type B. Ces dernières se divisent par mitose pour donner les spermatocytes I qui auront la capacité de rentrer en méiose.

b. Phase de croissance et maturation

On distingue deux types cellulaires qui caractérisent les deux phases de division de méiose :

1. Les spermatocytes primaires : présents de l'interphase au début de prophase I. Il s'agit d'une phase de synthèses importantes, avec la réplication de l'ADN afin d'obtenir 2n

chromosomes et 4c chromatides sœurs. Lors de la prophase, le matériel chromatinien subit un brassage génétique par formation de chiasmas entre chromosomes homologues. C'est la séparation aléatoire des homologues qui entrainera la diversité génétique par réassortiment des chromosomes, hérités du père et de la mère. Cette phase permet également la séparation aléatoire des chromosomes sexuels et dure 24 jours.

2. Les spermatocytes secondaires (II) abordent directement la deuxième division méiotique. Comme il n'y a ni duplication de l'ADN, ni recombinaison du matériel héréditaire, la deuxième division méiotique progresse rapidement et ne dure qu'environ 5 heures. La division des chromatides d'un spermatocyte secondaire donne naissance à deux spermatides haploïdes qui subiront ensuite une phase de différenciation.

Au fur et à mesure des divisions de mitoses, puis de méioses, les cellules germinales migrent de la membrane basale, en direction de la lumière des tubes séminifères (depuis le compartiment basal, en direction du compartiment adluminal) (figure 7)

c. Phase de différenciation cellulaire et spermiation

Cette phase se passe dans le compartiment adluminal des tubes séminifères (figure 7). Elle est caractérisée par la rupture des ponts cytoplasmiques liant les spermatides sœurs, et par une différenciation cellulaire radicale. Ces modifications sont regroupées sous le terme de spermiogénèse, qui dure 24 jours :

- * L'acrosome est issu de la convergence des vésicules golgiennes donnant une vésicule unique formant les 2/3 antérieurs de la tête et coiffant le noyau sur sa partie supérieure. Il contient des enzymes protéolytiques qui seront mobilisées lors de l'interaction avec le complexe cumulo-ovocytaire.
- * La condensation du noyau : changement de conformation de la chromatine permettant de réduire le volume au minimum (environ 1/3 de la tête).
- * La pièce intermédiaire : Les mitochondries se regroupent de façon spiralée autour de l'axonème formant la pièce intermédiaire. Elles sont indispensables pour l'apport énergétique afin d'assurer la propulsion des spermatozoïdes.
- * Le flagelle se développe à partir du centriole distal, se trouvant sous le noyau. Les microtubules constituant le centriole s'allongent progressivement en repoussant la membrane plasmique, formant la structure flagellaire.
- * Les restes de cytoplasmes non-utilisés sont progressivement refoulés sous la forme d'une gouttelette appelé « corps résiduel » le long de la tête.

La phase finale de la spermatogénèse se nomme la spermiation : c'est la libération du spermatozoïde dans la lumière du tube séminifère. Les cellules de Sertoli jouent un rôle majeur

dans cette phase puisqu'elles phagocytent la plupart du corps résiduel, ce qui permet de libérer le spermatozoïde dans la lumière. Les cellules de Sertoli secrètent le fluide testiculaire permettant aux spermatozoïdes de continuer leur chemin vers l'épididyme dans un environnement adapté. Elles sécrètent un transporteur de la testostérone permettant son action sur les spermatozoïdes dans la lumière. A ce stade les spermatozoïdes testiculaires sont morphologiquement complets, mais n'ont pas encore acquis leurs pouvoirs féconds.

d. Trajet intra-testiculaire et maturation épидидymaire

Les tubes séminifères se contractent afin de faire cheminer les spermatozoïdes dans le fluide testiculaire en direction du rete testis. Ils cheminent ensuite des canaux efférents jusqu'au canal épидидymaire où le fluide testiculaire est peu à peu remplacé par le fluide épидидymaire. L'avancée des spermatozoïdes dans l'épididyme est possible grâce à une pression intraluminaire qui décroît de la tête à la queue, cette chute de pression est associée à la contraction des cellules musculaires lisses de l'épididyme. La durée du transit est de 2 à 6 jours. Dans le canal épидидymaire, les spermatozoïdes subissent des modifications pour acquérir leurs fonctions complètes, on parle alors de « maturation épидидymaire ». En effet, l'épididyme constitue un environnement séquentiel qui se modifie de manière continue de la tête à la queue afin de permettre aux spermatozoïdes d'acquérir leurs pouvoirs féconds : la mobilité progressive, la réduction et les fonctions de régulation du volume de la tête, et la capacité à reconnaître la zone pellucide ovocytaire. Enfin, l'environnement au sein de la queue de l'épididyme permet de maintenir les spermatozoïdes dans un état de faible consommation d'énergie (concentration des spermatozoïdes, faible température de 34°C, pH acide et osmolarité élevée) pour les stocker et les protéger contre les agressions.

La maturation finale ou « capacitation » s'effectue au sein des voies génitales féminines par retrait des facteurs décapitant par la glaire cervicale permettant aux spermatozoïdes d'exprimer leurs pouvoirs féconds.

Nous allons maintenant développer les modifications chromatiniennes spermatiques qui se déroulent lors de la spermiogénèse et de la phase de maturation épидидymaire.

4. Les modifications de la chromatine pendant la spermiogénèse et la maturation épидидymaire

L'environnement au sein du tractus génital féminin est délétère pour le spermatozoïde. Pourtant, le spermatozoïde doit avoir la capacité de fournir un génome intègre à l'ovocyte, pour le bon développement embryonnaire. Ces capacités sont en partie dues à des modifications chromatiniennes singulières que l'on ne retrouve pas chez les cellules somatiques. Nous développerons les phases critiques de ces modifications dans cette partie.

a. Modification post-traductionnelle des histones

Chez les spermatogonies et les spermatocytes, les résidus Lysines des histones subissent une vague d'acétylation afin d'ouvrir le nucléosome, dans les régions transcriptionnellement actives. Puis les histones sont globalement désacétylées lors de la méiose et dans les spermatides rondes. Une seconde vague d'acétylation massive des histones s'opère à partir des spermatides allongées alors que, paradoxalement, le contexte transcriptionnel est inactif. Cette acétylation pourrait ainsi participer à l'enlèvement des histones grâce à la régulation par des variants d'histones (notamment « H2A.L.2 »), décrit par Barral *et al.*, (2017).

Une autre modification importante des histones est la méthylation de leurs résidus Lysines et Arginines. Cette méthylation marque des régions de l'hétérochromatine, et a des effets activateurs et répresseurs de la transcription, qui auraient un rôle important dans la régulation de la spermatogénèse.

Des histones subissent également une phosphorylation de leurs résidus Sérines, Thréonines ou Tyrosines. Cette phosphorylation entraîne une répulsion de charge entre l'ADN et les histones, perturbant leurs interactions physiques.

En effet l'ADN qui est sous forme libre et superenroulé au moment du remplacement des histones aura besoin d'être déroulé. Ce déroulement est générateur de cassures de l'ADN. La réparation de ces cassures passe par l'incorporation des protéines de transition et des protamines.

b. Incorporation de variants d'histones

Il existe des variants d'histones spécifique du testis. Ces variants ont une homologie de séquence avec les histones somatiques et auraient un rôle dans les étapes de programmation du génome mâle, lors de la phase de substitution des histones par les protamines. Les profils d'expression de ces variants d'histones sont très variables. Certains s'expriment tout au long de la spermatogénèse alors que d'autres s'expriment seulement à certains stades de la spermatogénèse. Leur incorporation permettrait une instabilité de la chromatine et ainsi des modifications structurales et fonctionnelles différentes de celles du nucléosome conventionnel. Cette incorporation de variants serait nécessaire pour le remplacement des histones du

nucléosome par les protéines de transition, puis par les protamines, nécessaire au compactage final du génome (Barral *et al.*, 2017).

c. Le remplacement des histones par les protéines de transition puis les protamines

Au cours de la spermiogénèse, phase de différenciation cellulaire radicale, il se produit un événement unique absent chez les cellules somatiques : les histones sont remplacées à 90% par des protéines de transition, puis des protamines permettant une meilleure protection de l'ADN contre les potentielles agressions, grâce à l'hyper-compaction chromatinienne. Ce mécanisme favoriserait également la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte mature (Barral *et al.*, 2017). Les gènes codant pour les protéines de transition et les protamines sont transcrits principalement dans les spermatides rondes puis les ARNm correspondants sont maintenus dans un état de traduction réprimé jusqu'à leur traduction dans les spermatides tardives.

Les protéines de transition sont des molécules fortement basiques, riches en résidus Arginines et Lysines se fixant de manière transitoire à l'ADN. Quatre protéines de transition ont été identifiées : de TP1 à TP4. Les protéines TP1 et TP2 représentent respectivement 50% et 40% des protéines nucléaires des spermatides et condensent la chromatine de façon accrue. Les gènes TP1 et TP2 sont transcrits dans les spermatides rondes, puis les ARN messagers correspondants sont stockés dans le cytoplasme pendant 3 à 7 jours après la transcription sous forme de ribonucléoprotéines avant d'être traduits dans les spermatides condensées.

L'intégration de ces protéines de manière transitoire permettrait la réduction du nombre des cassures de l'ADN et donc réduire le risque de perte d'intégrité du génome. Lorsqu'elles ne sont pas associées à l'ADN, les protéines de transition sont associées à une protéine chaperonne.

Les protamines sont principalement traduites dans les spermatides condensées, ce sont donc les protéines nucléaires majeures du stade tardif des spermatides et des spermatozoïdes. Ce sont des molécules basiques riches en arginines et en cystéines. L'homme possède deux protamines, PRM1 et PRM2 (portés par le chromosome 16 et localisés sur la région p13.13). PRM1 est directement traduite à partir de l'ARNm correspondant, PRM2 est synthétisée sous la forme d'un précurseur puis subit un clivage après son incorporation dans l'ADN. La richesse du domaine central des protamines en Arginine faciliterait leur interaction avec l'ADN en créant des liaisons hydrogènes entre l'ADN et les deux groupements amines des Arginines, on parle de domaine d'ancrage à l'ADN. De façon similaire aux protéines de transition, les protamines condensent l'ADN. Les protamines possèdent deux extrémités terminales enrichies en résidus Cystéines qui sont essentiels pour la compaction finale de la chromatine dans les spermatozoïdes.

Ces substitutions se font de la manière suivante : l'hyperacétylation préalable des histones diminue leurs affinités pour l'ADN et permet à l'ADN super-enroulé de se décondenser. Les boucles d'ADN se retrouvent alors libres, sans aucune contrainte physique, l'ADN est alors très instable. Les boucles entre les points d'ancrage des histones sont enlevées par des coupures simples ou doubles brins grâce à l'activité endonucléasique des topoisomérases de type II. Cette topoisomérase possède également la double fonction de religation temporaire de ces cassures jusqu'à leur réparation. En effet, ce sont les protéines de transition et les protamines qui lors de leur incorporation stimulent les mécanismes fins de réparation.

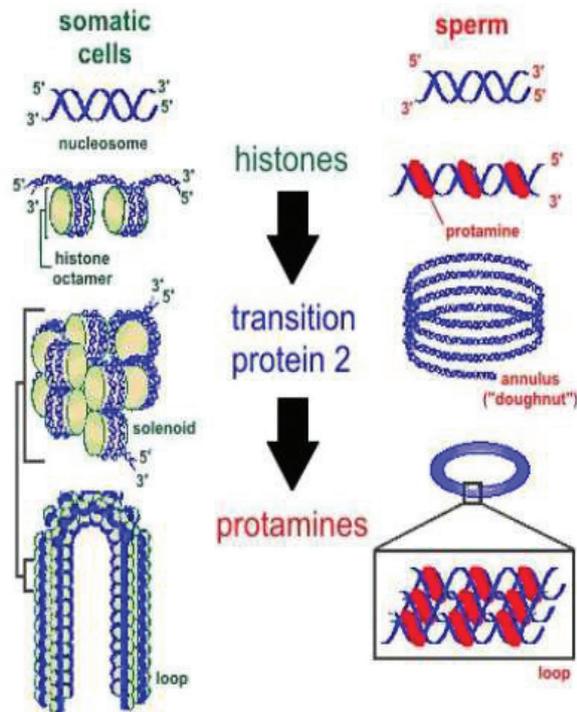
d. Impact de la maturation épидидymaire sur la chromatine

À la suite de la spermiogénèse, la chromatine complète sa condensation au sein de l'épididyme. C'est le rôle de la glutathion peroxydase 4 (GPx4) permettant l'oxydation des groupements thiols libres portés par les résidus cystéines contenus dans les protamines. Cette oxydation permet la formation de ponts disulfures qui verrouillent la structure condensée dans le noyau des spermatozoïdes. En effet, cette réaction permet de diminuer l'espace entre les protamines et ainsi, couplée aux mouvements d'eau et d'ions, entraîne une diminution de la taille de la tête spermatique. Le but de ces événements est d'acquérir une protection des spermatozoïdes et de permettre l'obtention d'une vitesse optimale lors de leur phase mobilité. Les ponts disulfures se forment progressivement au cours de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme. La glutathion peroxydase 5 (GPx5) sécrétée par l'épithélium de l'épididyme proximal contrôle le niveau luminal en H_2O_2 afin d'obtenir un équilibre. Par conséquent, un défaut de GPx5 entraîne des dommages oxydants de l'ADN, tandis qu'un défaut de GPx4 entraîne des défauts de condensation. On peut donc affirmer que le spermatozoïde est dans une situation paradoxale : c'est l'état de quiescence tant au plan transcriptionnel (la compaction extrême de l'ADN bloque l'accès aux polymérases) qu'au plan traductionnel (élimination de la plupart des organites cytoplasmiques lors de la spermiogénèse) qui leur permet une protection maximale contre les agressions mais c'est ce même état de quiescence qui les rend très fragiles et les rendent dépendant de mécanismes de protection au sein de leur environnement épидидymaire.

Ces ponts disulfures seront réduits au moment de la fécondation, juste après l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte afin de décondenser l'ADN. Cette oxydation est possible grâce à la mise à disposition d' H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la dismutation des anions superoxyde (O_2^-) issus principalement de la respiration cellulaire mitochondriale.

e. Structure finale de la chromatine

Figure 8 : Structure tridimensionnelle de l'ADN spermatique versus somatique. (D'après Braun *et al.*, 2001)



Contrairement aux cellules somatiques possédant une structure nucléosomale avec enroulement de l'ADN autour d'un octamère d'histones, la chromatine du spermatozoïde s'organise sous forme de nucléoprotamine, qui s'enroule sous forme de toroïde. Cette conformation augmente le niveau de compaction de la chromatine, comme nous le voyons sur la figure n°8.

Les remplacements massifs des protamines lors de la spermiogénèse n'est pas total. Il subsiste une proportion non négligeable d'histones dans le spermatozoïde de l'ordre de 10% (Gatewood *et al.*, 1987). Ces zones sont particulièrement fragiles étant donné qu'elles ne possèdent pas la compaction nécessaire à leur protection. Le

spermatozoïde conserve donc des marques épigénétiques (Ibrahim *et al.*, 2018). Ces marquages sont principalement présents au niveau de promoteurs de gènes nécessaires pour le développement embryonnaire précoce (Brykczynska *et al.*, 2010).

5. Origines des anomalies de maturation de l'ADN spermatique

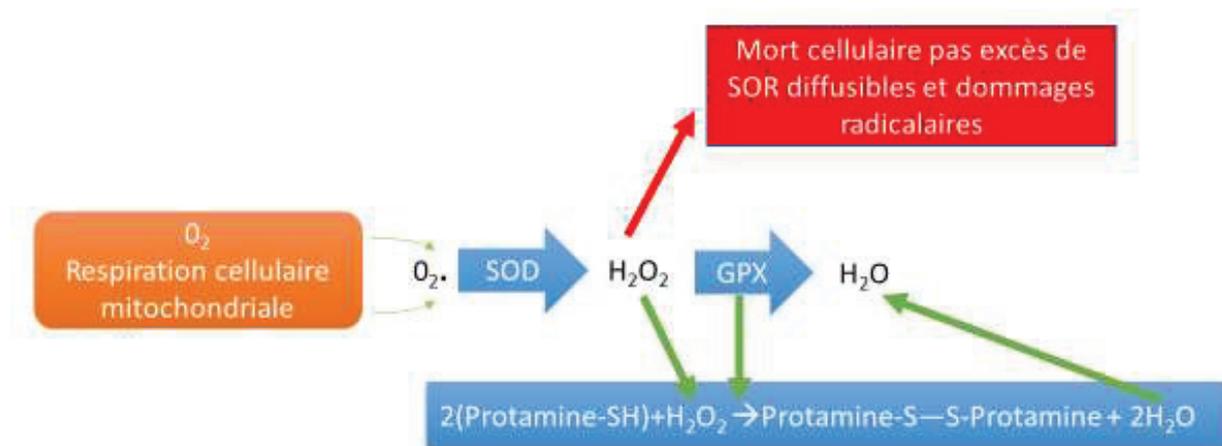
a. Défaut du remodelage de la chromatine spermatique et des mécanismes de réparation

Tout défaut dans le contrôle du processus de l'activité endonucléasique, qui provoque des cassures de l'ADN spermatique pour favoriser la protamination, peut entraîner une augmentation de la présence de spermatozoïdes fragmentés dans l'éjaculat. En effet, selon Amor *et al.*, (2017), le ratio normal PRM1/PRM2 est d'environ 1. Lorsque ce ratio est déséquilibré, ou lorsque la concentration en pré-protamine augmente on peut considérer que le processus de condensation est incomplet (Ni *et al.*, 2016). En effet si le nombre de protamines incluses est insuffisant, le nombre de ponts disulfures sera trop faible pour que la chromatine soit protégée. La quantité d'ADN toujours couplée aux histones sera supérieure à la normale et des cassures de l'ADN spermatique pourront persister. Le spermatozoïde étant haploïde à ce stade, il ne dispose pas de chromatine sœur pour pouvoir établir un mode de réparation par recombinaison homologue et reste très vulnérable.

b. Déséquilibre de l'homéostasie des substances réactives de l'oxygène (ROS).

Les substances oxygénées réactives (ROS) sont des agents oxydants comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les anions superoxydes (O_2^-) et les radicaux libres ($O_2\cdot$ et $O\cdot$). Comme nous l'avons vu précédemment ils sont indispensables et physiologiquement présents au sein de l'épididyme (figure n°9). Combinés avec d'autres molécules ils provoquent directement par oxydation des changements structuraux de la chromatine. On peut considérer qu'un déséquilibre homéostatique entre la génération des ROS et leur détoxification (figure 9) comme un facteur d'hypofertilité masculine (Aitken *et al.*, 2014). D'ailleurs, il semble que le stress oxydatif soit une des voies majeures du défaut de condensation de l'ADN (Muratori *et al.*, 2015). En ce sens, Aitken *et al.*, (2014) insiste sur le fait qu'il s'agit plutôt d'une augmentation du stress oxydant qu'une baisse de fonction des facteurs anti-oxydants. En effet, ces ROS en excès peuvent être générées : par des pathologies, comme la varicocèle par exemple, par les spermatozoïdes eux-mêmes afin de permettre leur autodestruction (cascade de signalisation cellulaire apoptotique) et également par les leucocytes présents en trop grande quantité dans les fluides épидидymaire. Nous sommes alors face à un cercle vicieux puisque l'augmentation du nombre de spermatozoïdes défectueux entretient l'augmentation du stress oxydant par apoptose des spermatozoïdes. De plus ces dommages oxydatifs sont également retrouvés sur l'albuginée et le tissu interstitiel testiculaire pouvant avoir une action négative sur sa fonction Sertolienne comme Leydigienne et ainsi sur la régulation hormonale de la spermatogénèse.

Figure 9: Homéostasie oxydo-réductionnelle au sein de l'épididyme.



c. Activité apoptotique anormale

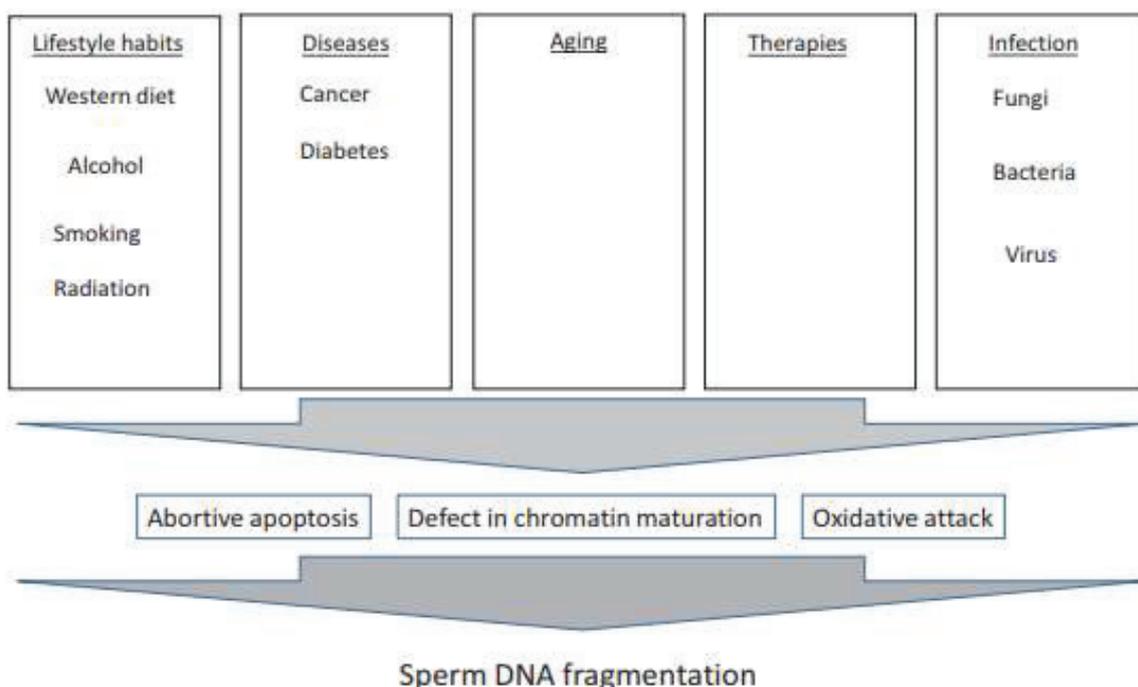
Comme nous l'avons dit précédemment, l'apoptose est indispensable à une bonne spermatogénèse, ce phénomène permet l'élimination des spermatozoïdes défectueux et

d'augmenter la concentration de spermatozoïdes ayant un haut potentiel fécondant dans la queue de l'épididyme. Dès les mitoses des spermatogonies, l'apoptose est un des mécanismes de régulation, permettant d'éviter un emballement de la division mitotique des spermatogonies Ad. Elle est également utilisée comme un moyen d'élimination du cytoplasme lors de la spermiogénèse car la gouttelette cytoplasmique exprime des signaux apoptotiques. Un des éléments majeurs de la signalisation cellulaire apoptotique est la protéine membranaire Fas (Sakkas *et al.*, 1999) qui est un facteur tumoral dans les cellules somatiques. Les cellules de Sertoli expriment des Fas liquant. Les cellules germinales possédant sur leur membrane la protéine Fas sont reconnues par les cellules de Sertoli *via* la liaison Fas liquant/Fas. Ces cellules germinales sont alors détruites par apoptose. Cette destruction semble s'opérer par voie endonucléasique et fragmente l'ADN en fragments de 50kb (Sotolongo *et al.*, 2005). Certains spermatozoïdes peuvent échapper à ce processus de destruction, ils poursuivent alors leur maturation tout en gardant des éléments de signature apoptotique, ce qui entraîne alors une fragmentation excessive de leur ADN.

d. Autres facteurs

Selon Muratori *et al.*, (2019), toute exposition à des agents cytotoxiques (chimiothérapie, radiothérapie, traitement de maladie chronique) et certains facteurs environnementaux (mode de vie, comorbidité, exposition professionnelle à des toxiques ou à la chaleur) peuvent induire des cassures anormales de l'ADN spermatique (figure 10).

Figure 10 : Facteurs environnementaux ayant un impact sur le taux de fragmentation de l'ADN spermatique. (D'après Muratori *et al.*, 2019)



6. Problématique du travail

Comme nous pouvons le voir dans cette introduction, la varicocèle aurait un impact sur la spermatogénèse. Ces défauts de spermatogénèse et de maturation chromatinienne pourraient être mesurables dans l'éjaculat, chez des hypofertiles porteurs d'une varicocèle. Pour vérifier cette hypothèse, nous proposons d'évaluer les paramètres spermatiques issus du spermogramme-spermocytogramme, test de migration survie et les marqueurs de l'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes. Les mesures seront réalisées avant et après embolisation de la varicocèle. La première étape de ce travail consiste à inclure les patients et à mesurer les paramètres spermatiques et chromatinien avant l'embolisation de leur varicocèle. La deuxième étape consistera à mesurer ces mêmes paramètres 3 mois après la réalisation de l'embolisation. La troisième étape consistera à éventuellement répéter ces mesures à 6 puis 12 mois et à comparer le résultat des patients pour lesquels une Fécondation *in vitro* aura été réalisée par rapport à une population témoin.

Dans cette thèse, nous réaliserons la première étape, c'est-à-dire l'étude préliminaire des résultats obtenus avant l'embolisation de la varicocèle. En effet, ce travail préliminaire nous permettra de décrire la première série de patients qui a été incluse. Il permettra également de valider nos méthodes d'analyses. Enfin nous pourrons comparer ces premiers résultats à la littérature et ainsi préciser nos objectifs afin de définir au mieux de quelle façon le travail doit être continué.

II. MATERIEL ET METHODE

1. Mise en place de l'étude

a. Choix du type d'étude.

Nous avons réalisé une étude prospective. Nous mettrons donc en place une étude de cohorte afin de faire bénéficier du traitement l'ensemble des patients inclus tout en restant non-interventionnel. Ces données brutes pourront être utilisées pour évaluer l'impact de l'embolisation de la varicocèle sur les anomalies spermatiques et pourront ensuite être intégrées dans d'autres travaux. L'étude est monocentrique nécessitant une étroite coopération avec l'équipe d'andrologie du centre. Une déclaration de l'étude a été réalisée au CHU et a été examinée par la commission du comité d'éthique d'établissement qui nous a rendu un avis positif.

b. Proposition d'une structure d'étude.

Pour ce mémoire, nous allons présenter les données acquises lors de la première étape du projet, ce sont donc des résultats préliminaires correspondant à 4 mois d'inclusion. A ce terme de l'inclusion, l'effectif est petit, nous resterons donc descriptifs sur les paramètres analysés.

c. Critères d'inclusion et d'exclusion.

Les critères d'inclusion et d'exclusion des patients sont résumés dans le tableau n°2.

Tableau 2: Mode d'inclusion dans l'étude

Critères d'inclusion	Critères d'exclusion
<ul style="list-style-type: none">- Homme, majeur.- Dans les limites d'âge légal pour la prise en charge en AMP.- Présenter un primo diagnostic d'une varicocèle clinique.- Hypofertilité primaire ou secondaire d'au moins 1 an.	<ul style="list-style-type: none">- Processus infectieux ou inflammatoire durant les 3 derniers mois.- Prise de traitement interférant avec la spermatogénèse.- Période d'abstinence non conforme au moment de la réalisation des examens spermatiques.- Patient à risque viral.- Anomalie de l'éjaculation.- Varicocèle déjà traité par une technique autre.- Varicocèle secondaire.- Antécédents de cancer avec chimiothérapie ou défaut chromosomique somatique

d. Méthode d'analyse statistique :

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel SPSS (SPSS v21 IBM, Ill, Chicago, EU). L'effectif étant de petite taille, les paramètres quantitatifs seront présentés sous la forme moyenne \pm écart-type avec la valeur de la médiane et l'étendue. Limité par l'effectif, aucune comparaison de moyenne n'a été effectuée à l'aide de tests statistiques. Les paramètres quantitatifs seront présentés sous la forme moyenne \pm écart-type avec la valeur de la médiane et l'étendue. Les corrélations entre le DNA fragmentation index (DFI) et le Sperm decondensation index (SDI) et les paramètres spermatiques ont été calculé avec le Rho de Spearman (r). Un coefficient de corrélation est considéré comme significatif, lorsque p est inférieur à 0,05.

2. Techniques d'analyses du sperme utilisées

a. Le spermogramme

Il s'agit d'une technique de routine accréditée dans notre centre. Le recueil se fait par masturbation au laboratoire après deux à cinq jours d'abstinence. Un protocole de désinfection des mains et des parties génitales est réalisé par le patient. L'analyse du sperme est réalisée à température ambiante après liquéfaction du sperme au moins 30 minutes après l'émission. D'emblée une partie de l'éjaculat est prélevée pour réaliser l'analyse bactériologique (spermoculture, PCR chlamydia). L'aspect du sperme est évalué : normal, hémorragique, purulent. Le volume est mesuré par pesée. La viscosité est évaluée à l'aide d'une pastette. Le pH est mesuré en utilisant les bandelettes pH-FIX® (Macherey NAGEL, Düren, Allemagne). La concentration spermatique est estimée en réalisant 2 dépôts de 10 μ L de sperme sur une lame recouverte d'une lamelle 22mm x 22mm au grossissement x400. Cette estimation de la concentration permet de déterminer la dilution à réaliser pour la numération précise avec une cellule de Thoma. La mobilité des spermatozoïdes est estimée à trois temps différents : 30 minutes après le recueil, puis 2 à 3h après le recueil et enfin \geq 4h après le recueil. L'opérateur procède à l'estimation des mobilités totales (a+b+c), progressives (a+b), mobiles sur place (c), et des immobiles (d). Le Mar Test SpermMar® (Fertipro, Beernem, Belgique) est réalisé, 30 à 60 minutes après l'émission du sperme. Le test est considéré comme positif si \geq 20% des spermatozoïdes mobiles sont attachés aux billes de latex. La vitalité est réalisée 30 à 60 minutes après l'émission du sperme par coloration à l'éosine. Pour la numération des spermatozoïdes, la dilution est faite selon l'estimation de la concentration en spermatozoïdes (effectuée lors de l'évaluation de la mobilité à l'examen direct lame/lamelle) dans du formol à 2%. On dépose ensuite 10 μ L de cette dilution dans les 2 chambres d'une cellule de Thoma. Si possible, au moins 200 spermatozoïdes dans chacune des 2 chambres de la cellule sont comptées et une moyenne des deux mesures est réalisée. Dans le même temps on réalise la

numération des cellules rondes. On réalise le pourcentage de leucocyte grâce au kit histochimique semi-quantitatif à la peroxydase Leucoscreen® (Fertipro, Beernem, Belgique). Pour réaliser le spermocytogramme on dépose entre 3 à 10 µL de sperme (selon la concentration spermatique) sur des lames à coloration rapide Testsimplets® (Waldeck, Münster, Allemagne). Les spermatozoïdes sont classés selon la classification de David modifiée. L'index d'anomalie multiple (IAM) est alors calculé suivant cette formule : Somme des anomalies totales / Nombre des spermatozoïdes atypiques.

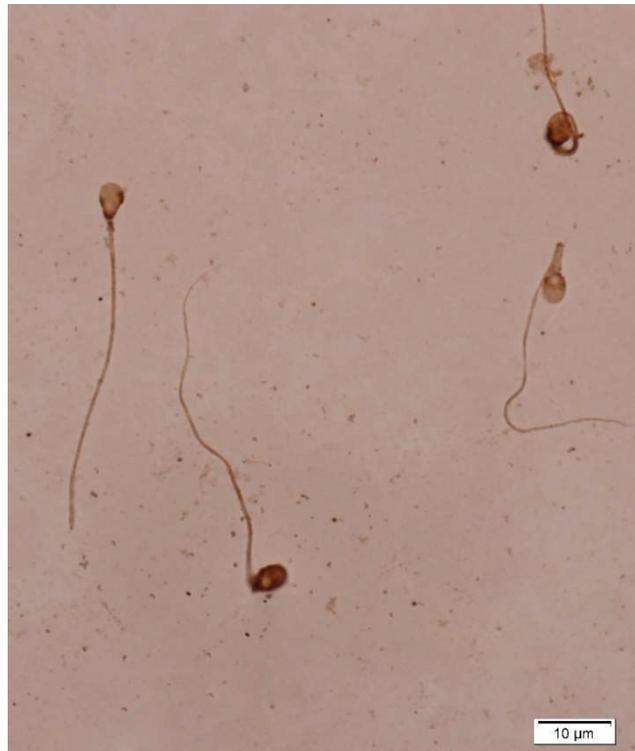
b. Le Test de migration survie

Il s'agit d'une technique de routine accréditée dans notre centre. L'objectif du test de migration survie est d'évaluer l'amélioration des caractéristiques spermatiques après sélection des spermatozoïdes par un gradient de densité discontinu. Un gradient à 3 couches (90, 70 et 50 %) de PureSperm100® (Nidacon, Mölndal, Suède) est réalisé par une dilution avec le milieu de culture Universal IVF Medium® (Origio, Måløv, Danemark). En fonction de l'estimation des caractéristiques spermatiques entre lame et lamelle, on dépose jusqu'à 1,5 mL maximum de sperme au-dessus du gradient préalablement préparé. Le tube est centrifugé durant 20 min à 394 g. Le plasma séminal et les couches 50% et 70% sont éliminés. La dernière fraction du gradient (90%) après remise en suspension est lavée avec 4 mL de Ferticul® (Fertipro, Beernem, Belgique). Après une centrifugation de 10 min à 701 g, le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans un volume de milieu de culture Universal IVF Medium® (Origio, Måløv, Danemark). Le volume de reprise est défini en fonction de la taille du culot (de 30 à 1000 µL). La préparation est incubée pour un minimum 30mn dans une étuve avec une température de 37°C et un taux de CO₂ à 5%. La concentration et la mobilité sont mesurées avec une cellule de Makler® (Sefi Medical Instruments, Haïfa, Israël). Six microlitres de sperme traité sont déposés sur la cellule de Makler, les numérations sont effectuées à 0, 2 et 24 heures en comptant séparément le nombre de spermatozoïdes totaux, mobiles totaux (a+b+c) et mobiles progressifs (a+b). Une nouvelle mesure de la morphologie des spermatozoïdes est effectuée sur la fraction traitée. Le pourcentage de formes typiques et atypiques est évalué sans détail pour apprécier la différence avec le sperme non traité.

c. Étude de la fragmentation de l'ADN spermatique par la technique TUNEL.

Il s'agit d'une technique de routine accréditée dans notre centre. La technique dite TUNEL pour Terminal Uridine Nick End Ligation, permet d'observer in situ la fragmentation de l'ADN nucléaire spermatique : les cassures simples ou doubles brins sont visualisées grâce à l'incorporation de nucléotides marqués, au niveau de l'extrémité 3'OH de ces cassures, par l'action d'une enzyme : la terminal désoxynucléotidyl transférase (TdT). Pour l'étude de la fragmentation 25 à 30 μ L de sperme traité (c'est-à-dire obtenu après sélection sur un gradient discontinu) sont déposés sur une lame et séchée à température ambiante pendant 24h, puis stockée à -20°C

Figure 11 : aspect microscopique des spermatozoïdes après protocole TUNEL, à l'objectif x100. (D'après Khalili et al., 2014)



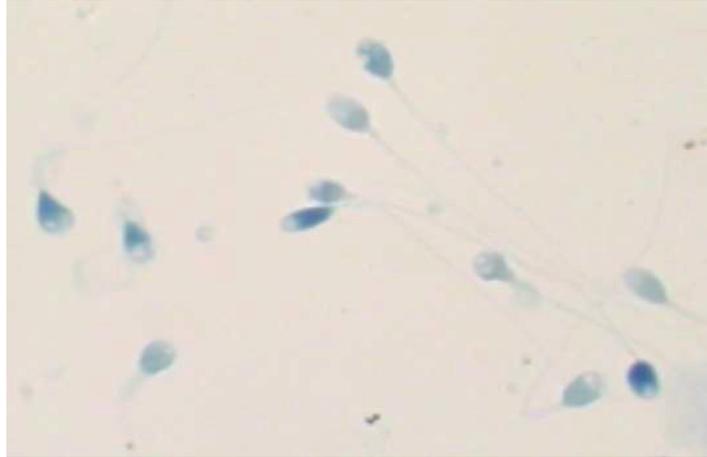
jusqu'à leur utilisation. Les cellules sont décongelées à température ambiante puis fixées avec du formol 4% et perméabilisées avec du PBS contenant 1% de triton X100® (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, États-Unis). La peroxydase endogène est inhibée avec de l' H_2O_2 diluée à 3%. L'élongation de l'ADN est effectuée grâce au Kit Apoptag® (Merck Millipore, Burlington, États-Unis). Les cellules sont d'abord incubées avec un tampon d'équilibration, puis incubées à 37°C avec une solution de Terminal d Transférase (TdT) pendant 1 heure, dans une chambre humide. L'élongation est stoppée avec la solution "Stop Reaction" du kit. La révélation de l'élongation est réalisée avec un anticorps anti-digoxigénine couplé à la peroxydase. Les sites de marquages sont révélés avec une incubation à la Di Amino Benzidine qui va réaliser un dépôt marron là où la peroxydase est présente. Les cellules non marquées sont contre-colorées avec de l'Hématoxyline de Harris pour faciliter le comptage. 500 spermatozoïdes sont comptés afin de calculer le taux de spermatozoïde anormalement fragmenté (DFI : DNA fragmentation index). Les noyaux spermatiques sont considérés comme fragmentés si plus de 50% de la surface de la tête spermatique est coloré en marron.

- d. Étude de la condensation de l'ADN spermatique par coloration au bleu d'aniline.

Cette technique n'est pas utilisée en routine dans notre centre mais possède un protocole déjà défini dans le cadre de la recherche. La coloration au bleu d'aniline permet de mesurer la persistance d'histones dans le noyau spermatique et par

Figure 12: aspect microscopique des spermatozoïdes après coloration au bleu d'aniline à l'objectif x100. (D'après Kim et al., 2013)

conséquent, le niveau de maturité nucléaire spermatique. Les histones sont des protéines principalement constituées de Lysines. Ces lysines vont réagir positivement à la coloration en prenant une couleur bleue. Les spermatozoïdes matures possèdent un noyau riche en protamines qui contient beaucoup de cystéine. Ces noyaux seront peu



ou pas colorés par le bleu d'aniline et seront alors très pâles ou incolores. Pour l'étude de la condensation de la chromatine, 25 à 30 μ L de sperme traité est déposé sur une lame qui est séchée à température ambiante pendant 24h puis stockée à -20°C . Les cellules sont fixées avec du formol 4% (pendant 10 minutes), puis rincées avec du PBS et mise à sécher à température ambiante pendant une nuit. Puis, les cellules sont rincées deux fois avec de l'eau distillée. Les cellules sont incubées avec du bleu d'aniline (Labo-moderne, Gennevilliers, France) 5% à pH 3,5 pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite rincées deux fois à l'eau distillée puis déshydratées dans des bains d'alcool (70° , 90° , 100°) pendant respectivement 3 minutes. Les lames sont montées avec de l'Eukitt© (Dutscher, Brumath, France). Un témoin négatif est réalisé, pour cela une lame est faite sans incubation préalable des échantillons avec le colorant. Chaque série de coloration est réalisée avec un témoin issu d'une même préparation de sperme afin de définir si la coloration est conforme. La lecture se fait en immersion à l'objectif x100 sous lumière blanche. Au total, 500 spermatozoïdes sont comptés pour chacune des lames analysées, en veillant à compter dans des zones dont l'étalement est homogène. Sont considérés comme positifs les spermatozoïdes colorés à plus de 50% de la surface de la tête. Une moyenne des comptages est réalisée sur 3 lectures afin de déterminer le taux de spermatozoïdes anormalement condensés (SDI : Sperm Decondensation Index).

III. Résultats

1. Données à l'inclusion

Lors de la rédaction de ce mémoire, nous avons inclus 17 patients. Dans cette cohorte, nous avons exclu 5 patients pour les raisons suivantes : pour un patient présentait une absence de reflux à l'échographie et il n'y avait pas d'indication de traiter ultérieurement la varicocèle. Pour un patient, il y avait une absence de reflux à la manœuvre de Valsalva, ce patient a été exclu de l'étude. Pour un couple, survenue d'une grossesse spontanée à la suite de l'embolisation de la varicocèle, l'homme n'a pas souhaité continuer à être intégré dans la cohorte. Pour deux patients, il y a eu un échec d'embolisation, ces patients ont été exclus étant donné qu'ils ne pourraient pas continuer l'étude. Le tableau 3 fait un récapitulatif des principales données cliniques des patients inclus actuellement dans l'étude (n = 12). Les délais d'hypofertilité, l'âge moyen et l'IMC sont cohérent avec les valeurs moyennes dans notre centre. Le volume testiculaire moyen est normal, ce qui est cohérent avec les bilans hormonaux, qui sont tous normaux dans cette cohorte.

Tableau 3 : Descriptif des données cliniques

Paramètres cliniques	Moyenne \pm écart type	Médiane	Étendue
Délai hypofertilité (ans)	2,1 \pm 1,3	2,0	0,7 ; 5,0
Age (ans)	35,6 \pm 5,5	34,6	26,7 ; 46,8
IMC (kg·m ⁻²)	25,2 \pm 2,1	24,3	23,6 ; 29,4
Volume testiculaire Gauche (mL)	15,0 \pm 4,1	15,0	8,0 ; 20,0
Volume testiculaire Droit (mL)	16,5 \pm 3,2	15,0	10,0 ; 20,0

IMC = Indice de masse corporelle.

Sur les 12 patients inclus, 2 sont des anciens fumeurs, 7 n'ont jamais fumé et 3 continuent à fumer. Un patient (1/12) a consommé du cannabis et a arrêté, un patient (1/12) consomme du cannabis tout en fumant du tabac. Chez les 2 patients présentant des troubles de la sexualité, un patient (1/12) a des troubles de l'érection (impuissance faible à la varicocèle) et un patient (1/12) a des troubles de la libido. Aucun des patients inclus n'a de maladie chronique. La varicocèle est à gauche pour l'ensemble de la cohorte. Sept patients (7/12) travaillent dans le secteur tertiaire. Les 5 autres patients travaillent dans le secteur secondaire, dont un est exposé à des solvants. Huit patients ont une varicocèle de grade 3, 2 une varicocèle de grade 2, et 2 de faible grade, selon Dubin et Amelar. L'ensemble de la population a bénéficié d'un écho-doppler scrotal afin de confirmer radiologiquement la varicocèle. Les spermocultures et PCR chlamydia sont négatives pour l'ensemble de notre cohorte.

2. Caractéristiques spermatiques de la cohorte

Les paramètres spermatiques initiaux sont caractérisés, par des caractéristiques spermatiques moyennes normales par rapport aux normes de l’OMS, si ce n’est les valeurs moyennes de la mobilité totale et progressive (au 3 temps de mesures) qui sont modérément abaissées, il en est de même pour le pourcentage moyen de formes typiques. Il est à noter que la concentration moyenne en cellules rondes semble importante ($3,5 \pm 2,7$ M/mL) (Tableau 4).

Tableau 4 : Paramètres du spermogramme-spermocytogramme

Paramètres	Moyenne \pm écart-type	Médiane	Étendue
pH	8,0 \pm 0,2	7,9	7,6 ; 8,4
volume (mL)	3,5 \pm 2,1	3,2	0,9 ; 8,0
Concentration (Millions/mL)	66,6 \pm 62,2	48,2	0,9 ; 205,0
Numération (Millions/éjaculat)	223,4 \pm 275,1	71,9	2,6 ; 761,9
Vitalité (%)	72,0 \pm 20,6	81,0	27,0 ; 91,0
Cellules rondes (Millions/mL)	3,5 \pm 2,7	3,0	1,0 ; 10,0
Leucocytes (Millions/mL)	1,0 \pm 2,1	0,1	0,0 ; 6,0
Mobilité (%) initiale			
Totale (a+b+c)	38,7 \pm 10,7	40,0	20,0 ; 50,0
Progressive (a+b)	29,2 \pm 13,3	28,0	10,0 ; 50,0
Mobilité (%) à 2 heures			
Totale (a+b+c)	35,0 \pm 11,5	40,0	15,0 ; 50,0
Progressive (a+b)	26,9 \pm 12,4	26,0	10,0 ; 45,0
Mobilité (%) à 4 heures			
Totale (a+b+c)	33,7 \pm 13,0	40,0	15,0 ; 50,0
Progressive (a+b)	23,9 \pm 12,9	25,0	10,0 ; 40,0
Formes typiques (%)	12,1 \pm 9,8	9,0	2,0 ; 29,0
IAM	1,8 \pm 0,2	1,7	1,5 ; 2,1

IAM = Index d’anomalies multiples.

Quant aux paramètres issus du test de migration-survie (Tableau 5), ils sont caractérisés par une amélioration de la mobilité totale ($67,2\% \pm 25,6\%$ vs $35,0\% \pm 11,5\%$), la mobilité progressive ($60,7\% \pm 26,1\%$ vs $29,2 \pm 13,3\%$) et le pourcentage de forme typique ($15,5 \pm 11,9\%$ vs $12,1\% \pm 9,8\%$) avec un nombre de spermatozoïdes typique mobiles moyen à 9,5 millions dans la préparation après sélection

Tableau 5 : Paramètres issus des tests de migration-survie

Paramètres	Moyenne ± écart-type	Médiane	Étendue
Numération initiale (million/éjaculat)			
Totale	44,6 ± 70,1	18,1	0,4 ; 195,5
Mobile	23,6 ± 43,5	10,5	0,2 ; 155,8
Mobile progressive	21,1 ± 39,7	8,3	0,1 ; 141,7
Numération à 2 heures (million/éjaculat)			
Totale	55,7 ± 87,1	18,3	0,4 ; 257,8
Mobile	31,3 ± 57,9	11,2	0,2 ; 198,3
Mobile progressive	29,2 ± 54,2	8,3	0,2 ; 184,2
Mobilité à 2 heures (%)			
Mobilité totale	67,2 ± 25,6	76,9	10,2 ; 94,3
Mobilité progressive	60,7 ± 26,1	71,4	8,9 ; 94,3
Numération à 24 heures (million/éjaculat)			
Totale	64,3 ± 94,3	22,3	2,4 ; 277,7
Mobile	38,7 ± 76,4	8,3	2,1 ; 249,3
Mobile progressive	34,7 ± 68,2	6,6	1,4 ; 221,0
Formes typiques (%)	15,5 ± 11,9	10,0	4,0 ; 38,0
NTMSI	9,5 ± 20,9	2,0	0,0 ; 70,0

NTMSI = Nombre de spermatozoïdes typiques mobiles dans l'inséminât.

3. Corrélation entre le DFI et SDI avec les paramètres spermatiques

Il n'y a pas de corrélation significative entre le SDI et le DFI ($r = 0,07$ avec $p = 0,829$). Parmi les différents paramètres spermatiques, il existe une corrélation positive significative entre le DFI et le volume spermatique ($r = 0,620$ avec $p = 0,027$), et négative significative entre le DFI et la mobilité initiale totale spermatique ($r = -0,655$ avec $p = 0,021$) (Tableau 5). Pour le SDI, il existe une corrélation positive significative avec le pH ($r = 0,763$ avec $p = 0,017$) (Tableau 6).

Tableau 6 : Corrélations entre le DFI et le SDI et les caractéristiques spermatiques.

	DFI		SDI	
	r	Valeur de p	r	Valeur de p
Age	0.112	0.729	0.091	0.779
BMI	0.347	0.399	-0.587	0.126
pH	-0.328	0.389	0.763	0.017
volume (mL)	0.634	0.027	0.133	0.680
Concentration (Millions/mL)	0.527	0.096	0.018	0.958
Numération (Millions/éjaculat)	0.552	0.063	0.098	0.762
Vitalité (%)	-0.283	0.460	-0.017	0.966
Cellules rondes (Millions/mL)	-0.050	0.898	0.633	0.067
Leucocytes (Millions/mL)	0.100	0.798	0.617	0.077
Mobilité (%) initiale				
Totale (a+b+c)	-0.655	0.021	-0.276	0.385
Progressive (a+b)	-0.555	0.061	-0.492	0.104
Mobilité (%) à 2 heures				
Totale (a+b+c)	-0.475	0.197	-0.373	0.323
Progressive (a+b)	-0.462	0.210	0.412	0.271
Mobilité (%) à 4 heures				
Totale (a+b+c)	-0.506	0.164	-0.236	0.540
Progressive (a+b)	-0.323	0.396	-0.179	0.645
Formes typiques (%)	-0.073	0.863	0.390	0.339
IAM	-0.036	0.933	-0.431	0.286

DFI = DNA fragmentation index. SDI = Sperm Decondensation index. IAM = Index d'anomalies multiples.

Pour les paramètres du TMS, il existe des corrélations significatives entre le DFI et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles total ($r = -0.673$ avec $p = 0.023$) et progressifs ($r = -0.882$ avec $p = 0.001$). Il existe une corrélation positive signification entre le SDI et le pourcentage de spermatozoïdes de formes typiques après sélection ($r = 0,629$ avec $p = 0,038$) (Tableau 7).

Tableau 7 : Corrélations entre le DFI et le SDI et les résultats du TMS.

Paramètres	DFI		SDI	
	r	Valeur de p	r	Valeur de p
Numération initiale (million/éjaculat)				
Totale	0.406	0.191	0.049	0.880
Mobile	0.238	0.457	0.091	0.779
Mobile progressive	0.238	0.457	0.091	0.779
Numération à 2 heures (million/éjaculat)				
Totale	0.291	0.385	0.100	0.770
Mobile	0.064	0.853	0.136	0.689
Mobile progressive	-0.018	0.958	0.118	0.729
Mobilité à 2 heures (%)				
Mobilité totale	-0.673	0.023	-0.073	0.832
Mobilité progressive	-0.882	0.001	-0.100	0.770
Numération à 24 heures (million/éjaculat)				
Totale	0.333	0.347	0.042	0.907
Mobile	0.067	0.855	0.018	0.960
Mobile progressive	-0.055	0.881	0.139	0.701
Formes typiques (%)	0.105	0.759	0.639	0.038
NTMSI	-0.145	0.670	0.136	0.689

DFI : DNA fragmentation index. SDI : Sperm decondensation index. TMS : Test de migration-survie. NTMSI = Nombre de spermatozoïdes typiques mobiles dans l'inséminât.

En fonction de la classification de Dublin & Amelar, le DFI et le SDI semblent plus important lorsque la classification est inférieure à 3 (Tableau8).

Tableau 8 : DFI et SDI en fonction de la gravité de la varicocèle (moyenne ± écart type)

	Classification clinique de Dublin & Amelar	
	< 3	> 3
Effectif	2	8
DFI	14.1 ± 8.6	9.8 ± 8.1
SDI	62.0 ± 35.4	34.5 ± 20.6

IV. DISCUSSION

Notre cohorte d'hommes hypofertiles porteurs de varicocèle semble avoir pour tendance des altérations spermatiques modérées avec un DFI subnormal ($13,8\% \pm 10,2\%$) et un SDI augmenté ($41,4\% \pm 23,8\%$). Dans cette étude préliminaire nous avons montré que le DFI était corrélé positivement au volume spermatique, négativement à la mobilité totale spermatique initiale, négativement aux pourcentages de spermatozoïdes mobiles totaux et progressifs obtenus après le TMS. Il semblerait donc qu'il y ait un lien entre l'élévation du DFI et les altérations de la mobilité. Ces résultats vont dans le sens de ceux trouvés par Alargkof *et al.*, (2019) qui compare la fragmentation de l'ADN spermatique dans 3 groupes : les patients ayant une varicocèle avec des paramètres spermatiques normaux, les patients ayant une varicocèle avec des paramètres spermatiques anormaux et un groupe contrôle. Cette étude a montré l'existence d'une liaison entre un DFI élevé et la présence varicocèle indépendamment des paramètres spermatiques ($p < 0,001$). De plus, dans le groupe des patients porteur d'une varicocèle, il a été montré une liaison significative entre l'augmentation du DFI et des altérations de la mobilité progressive, de la vitalité et de la morphologie ($p < 0,001$). On peut considérer que l'asthénozoospermie pourrait expliquer l'hypofertilité pour une partie de nos patients (Björndahl *et al.*, 2010). En effet, on peut émettre l'hypothèse que le défaut de mobilité serait la conséquence d'une fragmentation excessive de l'ADN spermatique, et marque un dysfonctionnement soit lors de l'acquisition de la mobilité pendant la maturation épидидymaire (là où le taux de stress oxydant est le plus important), soit à une incapacité à acquérir une mobilité dû à des dommages plus précoces (Muratori *et al.*, 2018). Ces résultats sont comparables à ceux d'Agarwal *et al.*, (2016) qui nous propose une approche par méta-analyse. Dans son travail, une dizaine d'études traitant de l'impact de la varicocèle sur les paramètres spermatiques est rassemblé. Des baisses significatives de la mobilité ($p < 0,001$), du nombre de spermatozoïdes typiques ($p = 0,007$) chez les porteurs de varicocèle ont été retrouvées.

Le SDI est corrélé positivement au pH du sperme et au pourcentage de spermatozoïdes avec une forme typique obtenue après le TMS. Ces résultats vont dans le sens de l'analyse morphométrique de Kipper *et al.*, (2017), où un défaut de condensation de la chromatine entraîne des modifications de forme et de volume de la tête. On peut alors émettre l'hypothèse que ces spermatozoïdes atypiques ne sont pas sélectionnés lors du traitement du sperme par gradient de sélection. Pourmasumi *et al.*, (2019) évalue la corrélation entre la coloration au bleu d'aniline et les paramètres spermatiques. Il compare une population contrôle *versus* une cohorte de patients normozoospermiques hypofertiles. Selon cette étude, le bleu d'aniline a une corrélation négative avec la morphologie uniquement chez les patients infertiles ($p < 0,001$). Cet auteur retrouve une également corrélation négative entre SDI et mobilité progressive des spermatozoïdes ($p < 0,001$). Selon cet auteur, il semble donc exister un lien entre infertilité et augmentation du taux de spermatozoïde mal condensé dans l'éjaculat, la

présence d'une varicocèle chez les patients inclus n'est pas prise en compte. Talebi *et al.*, (2008) évalue la condensation de la chromatine par bleu d'aniline en comparant une population de patients infertiles porteurs d'une varicocèle, une population de patients infertiles sans varicocèle et un groupe contrôle indemne. Le taux de spermatozoïdes mal condensés est significativement plus haut dans le groupe de patients infertiles porteur d'une varicocèle par rapport aux autres groupes de patients ($p < 0,001$). Ces résultats sont confirmés par l'étude plus récente de Sadek *et al.*, (2011) qui a utilisé le même protocole.

Nous avons montré une absence de corrélation entre le DFI et le SDI. Ceci irait dans le sens où le SDI apporterait des informations complémentaires au DFI, en ce qui concerne la qualité du noyau spermatique. Ceci nous permet de comprendre qu'un défaut de maturité de la chromatine spermatique pourrait être présent sans que l'ADN soit anormalement fragmenté. En effet, la qualité de compaction chromatinienne contribue à la qualité finale du génome fourni à l'ovocyte, pour le bon déroulement de la cinétique du développement embryonnaire. Il est donc possible d'obtenir, dans certains cas, des anomalies de développements embryonnaire alors que le DFI était normal. De plus, la mesure du DFI et du SDI est principalement utilisé en tant que facteur pronostic pour les chances de réussite de la tentative en AMP (Bichara *et al.*, 2019 ; Benchaïb *et al.*, 2003). Notre objectif étant d'évaluer l'impact du traitement de la varicocèle sur ces deux biomarqueurs, la comparaison à d'autres études semble difficile.

Nous n'avons pas montré de corrélation entre l'âge et le DFI, et l'âge et le SDI dans notre cohorte. Toutefois, notre échantillon étant petit avec une dispersion des âges restreinte ($35,6 \pm 5,5$ ans), nous ne sommes pas dans les conditions *optima* pour mettre en évidence l'existence ou non de cette relation. En effet, selon Hachemi *et al.*, (2019), plus l'homme est d'âge avancé plus l'incidence de la varicocèle sur la spermatogenèse serait importante et plus le DFI serait élevé. Pour cet auteur, la varicocèle serait dynamique et évoluerait continuellement jusqu'à ce qu'elle se révèle cliniquement avec un impact plus ou moins important sur la spermatogenèse. Il semble donc licite de tenir compte du délai d'exposition à la pathologie, différent d'un patient à l'autre, et de l'âge des patients pour l'interprétation futur des résultats. De même nous n'avons pas mis en évidence de corrélation significative entre l'IMC et le DFI et l'IMC et le SDI. La méta-analyse de Song *et al.*, (2019) montre que l'incidence de la varicocèle serait supérieure chez les populations à des patients ayant un IMC normal ou bas. L'IMC élevé serait protecteur sur la survenue de la varicocèle. La taille de notre cohorte ne nous permet pas de mettre en évidence un « effet de dose » entre la gravité de la varicocèle selon la classification de Dubin & Amelar et la gravité de l'atteinte des marqueurs d'intégrité chromatinienne comme il a été montré par Pallotti *et al.*, (2018). Cet auteur, grâce à des données acquises de façon rétrospective sur 4000 patients, a réparti sa cohorte en deux groupes : les patients présentant une varicocèle de bas grade (<3 selon Dubin et Amelar) et de haut grade (de grade 3). La comparaison des deux groupes montre une différence significative pour la numération, la mobilité progressive et le taux de spermatozoïdes

atypiques. En effet, la gravité de la varicocèle semble un élément important à prendre en compte pour évaluer si le traitement de la varicocèle à un intérêt pour le patient. Selon Sadek *et al.*, (2011), l'amélioration du taux de condensation en post opératoire serait significative uniquement lorsqu'il s'agit d'une varicocèle de grade 3.

Notre étude préliminaire présente des limites. La limite la plus importante de notre travail est la taille réduite de notre effectif, problème qui pourrait être résolu par l'augmentation du temps d'inclusion des patients et/ou par la mise en place d'une étude multicentrique. La constitution d'un groupe contrôle semble indispensable dans le cadre de la poursuite de ce travail. Comme nous l'avons vu précédemment dans l'étude de Talebi *et al.*, (2008), l'idéal serait de former trois groupes : infertiles porteurs d'une varicocèle, infertiles sans varicocèle et sains. Il pourrait être également intéressant de constituer un groupe de porteur de varicocèle fertile, mais cela semblerait logistiquement difficile, d'autant plus que ces porteurs de varicocèle ayant prouvé leur fertilité pourraient être d'un âge sensiblement plus élevé et surtout ne viendraient pas consulter dans un service d'AMP. Les groupes seraient donc difficilement comparables. De plus, il existe dans notre étude un biais de sélection, en effet, pour que le DFI et le SDI soient quantifiables, il faut une concentration spermatique >2,5 millions/mL. Ainsi les patients présentant une oligospermie sévère sont exclus. Cette population, patients ayant une oligospermie sévère, serait intéressante à évaluer puisque leur éligibilité au traitement de la varicocèle est prouvée, que ce soit pour améliorer les paramètres spermatiques ou en mesure adjuvante avant une biopsie testiculaire (Kohn *et al.*, 2017). Une autre limite de notre étude est la prise éventuelle d'un traitement antioxydant par les patients avant la réalisation des mesures. Nous avons décidé de prendre en compte la date de première remise d'ordonnance de ces compléments alimentaires. La durée d'exposition moyenne au moment de la réalisation des examens étant de 37,1 jours, son impact sur l'interprétation des paramètres, et plus particulièrement sur le DFI, serait minime (Busetto *et al.*, 2019), bien que nous ne maîtrisons pas la composition de ces compléments qui peut être différente en fonction du prescripteur (Smith *et al.*, 2019). Le DFI est positivement corrélé avec le volume moyen de l'éjaculat et pourrait être en rapport avec un délai d'abstinence sexuelle trop important. Le délai depuis la dernière éjaculation semble donc indispensable à intégrer dans notre étude afin de tenir compte de ce paramètre dans l'interprétation des résultats. En effet, selon Greening *et al.*, (2007), le DFI diminue lorsque l'écart entre deux éjaculations diminue.

Les biais de confusion sont nombreux et doivent être corrigés dans la mesure du possible. La varicocèle est un facteur parmi d'autre ayant un impact sur l'intégrité de la chromatine Aitken *al.*, (2014). Pokhrel *et al.*, (2019) a montré l'impact des seuls facteurs environnementaux et du mode de vie sur l'altération de la qualité spermatiques, notamment sur la mobilité progressive et le taux de spermatozoïdes de forme typique. L'approche statistique multivariée, comportant des données d'anamnèse exhaustives, semble donc une approche intéressante pour évaluer

le niveau de dépendance des altérations spermatiques par rapport à la présence d'une varicocèle.

En conclusion, nos premiers résultats montrent l'existence de corrélations entre le DFI, le SDI et les paramètres spermatiques, dans cette cohorte de patients hypofertiles porteurs d'une varicocèle. Malgré la très faible puissance statistique de nos données, ces premiers résultats sont cohérents avec la littérature. Les protocoles d'analyse du sperme mis en place dans ce travail sont donc validés et semblent nous apporter les informations nécessaires à la poursuite de l'étude.

Grâce à ces résultats préliminaires, nous avons pu définir les éléments à améliorer pour la poursuite du travail : avant tout, l'augmentation de la taille de la cohorte semble indispensable pour obtenir la puissance nécessaire. Pour cela le temps d'inclusion doit être augmenté. D'autres centres pourraient être inclus, malgré les biais inhérents aux études multicentriques, comme les biais techniques. Afin de continuer le travail, nous proposons d'effectuer la mesure de ces mêmes paramètres après scléro-embolisations de la varicocèle à 3 mois post-embolisation. Nous partons de l'hypothèse que la scléro-embolisation de la varicocèle permettrait d'améliorer les caractéristiques spermatiques et l'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes. L'analyse statistique devra être multivariée afin d'inclure des données exhaustives d'anamnèse afin d'affiner le niveau de dépendance des résultats de la présence de la varicocèle. De plus les résultats des tentatives de fécondation *in vitro* réalisées après embolisation des patients inclus pourraient permettre de juger de façon plus globale de l'intérêt de la scléro-embolisation sur les tentatives d'AMP. A condition que ces résultats post-FIV soient comparés à une population témoin qui n'a pas reçu le geste d'embolisation de la varicocèle. En effet la littérature reste discordante à l'heure actuelle sur l'intérêt de traiter la varicocèle, lorsqu'elle prend en compte la qualité de la tentative, le taux de grossesse et de naissance vivante (Bichara *et al.*, 2019 ; Hachemi *et al.*, 2019 ; Irez *et al.*, 2018).

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abdelbaki SA, Sabry JH, Al-Adl AM, Sabry HH. The impact of coexisting sperm DNA fragmentation and seminal oxidative stress on the outcome of varicocelectomy in infertile patients: A prospective controlled study. *Arab Journal of Urology*. 2017;15(2):131-139.
2. Aboulmaouhib S, Madkour A, Kaarouch I, Sefrioui O, Saadani B, Copin H. Impact of alcohol and cigarette smoking consumption in male fertility potential: Looks at lipid peroxidation, enzymatic antioxidant activities and sperm DNA damage. *Andrologia*. 2018;50(3):e12926.
3. Afsin M, Otludil B, Dede O, Akkus M. An examination on composition of spermatozoa obtained from pre-operative and post-operative varicocele patients. *Reproductive Biology*. 2018;18(4):361-367.
4. Agarwal A, Sharma R, Harlev A, Esteves SC. Effect of varicocele on semen characteristics according to the new 2010 World Health Organization criteria: a systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl*. 2016;18(2):163-170.
5. Aitken R, Smith T, Jobling M, Baker M, De Iuliis G. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl*. 2014;16(1):31-38.
6. Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl*. 2011;13(1):36-42.
7. Aitken RJ, Smith T, Jobling M, Baker M, De Iuliis G. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl*. 2014;16(1):31-38.
8. Al Omrani B, Al Eisa N, Javed M, Al Ghedan M, Al Matrafi H, Al Sufyan H. Associations of sperm DNA fragmentation with lifestyle factors and semen parameters of Saudi men and its impact on ICSI outcome. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018;16(1):49.
9. Alargkof V, Kersten L, Stanislavov R, Kamenov Z, Nikolinakos P. Relationships between sperm DNA integrity and bulk semen parameters in Bulgarian patients with varicocele. *Arch Ital Urol Androl*. 2019;91(2):125.
10. Alsaikhan B, Alrabeeah K, Delouya G, Zini A. Epidemiology of varicocele. *Asian J Androl*. 2016;18(2):179-181.
11. Amor H, Zeyad A, Ali HB, Hammadeh M. Protamines ratio (P1/P2) in spermatozoa as biomarker for male infertility. *Fertility and Sterility*. 2017;108(3):e142.
12. Arifulin EA, Bragina EE, Kurilo LF, Sheval EV. High-throughput analysis of TUNEL-stained sperm using image cytometry. *Cytometry A*. 2017;91(9):854-858.
13. Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, Dohle G, Jarvi K, Salonia A. Varicocele and Male Factor Infertility Treatment: A New Meta-analysis and Review of the Role of Varicocele Repair. *European Urology*. 2011;60(4):796-808.
14. Barral S, Morozumi Y, Tanaka H, Montellier E, Govin J, de Dieuleveult M, Charbonnier G, Couté Y, Puthier D, Buchou T, Boussouar F, Urahama T, Fenaille F, Curtet S, Héry P, Fernandez-Nunez N, Shiota H, Gérard M, Rousseaux S, Kurumizaka H, Khochbin S. Histone variant H2A.L.2 guides transition protein-dependent protamine assembly in male germ cells. *Mol Cell*. 2017;66(1):89-101.
15. BENCHAIIB M, BRAUN V, LORNAME J, HADJ S, SALLE B, LEJEUNE H. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod*. 2003;18(5):1023-1028.
16. Benoff S, Jacob A, Hurley IR. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Update*. 2000;6(2):107-121.
17. Bichara C, Berby B, Rives A, Jumeau F, Letaille M, Setif V. Sperm chromatin condensation defects, but neither DNA fragmentation nor aneuploidy, are an independent predictor of clinical pregnancy after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(7):1387-1399.

18. Bolat MS, Kocamanoglu F, Gulsen M, Sengul M, Asci R. The impact of age on fertility rate in patients who underwent microsurgical varicocelectomy. *Andrologia*. 2019;51(4):e13234.
19. Borges E, Braga DP de AF, Provenza RR, Figueira R de CS, Iaconelli A, Setti AS. Paternal lifestyle factors in relation to semen quality and in vitro reproductive outcomes. *Andrologia*. 2018;50(9):e13090.
20. Braun RE. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature Genetics*. 2001;28(1):10-12.
21. Brykczynska U1, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, Roloff TC, Beisel C, Schübeler D, Stadler MB, Peters AH. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17(6):679-687.
22. Busetto GM, Agarwal A, Virmani A, Antonini G, Ragonesi G, Del Giudice F. Effect of metabolic and antioxidant supplementation on sperm parameters in oligo-astheno-teratozoospermia, with and without varicocele: A double-blind placebo-controlled study. *Andrologia*. 2018;50(3):e12927.
23. Cantoro U, Polito M, Muzzonigro G. Reassessing the Role of Subclinical Varicocele in Infertile Men With Impaired Semen Quality: A Prospective Study. *Urology*. 2015;85(4):826-830.
24. Cavallini G, Scropo FI, Colpi GM. The clinical usefulness of a novel grading system for varicoceles using duplex Doppler ultrasound examination based on postsurgical modifications of seminal parameters. *Andrology*. 2019;7(1):62-68.
25. Cho C-L, Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC. A single cut-off value of sperm DNA fragmentation testing does not fit all. *Transl Androl Urol*. 2017;6(S4):501-503.
26. Chohan KR. Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. *Journal of Andrology*. 2006;27(1):53-59.
27. Clavijo RI, Carrasquillo R, Ramasamy R. Varicoceles: prevalence and pathogenesis in adult men. *Fertility and Sterility*. 2017;108(3):364-369.
28. Comar V, Ricci J, Dieamant F, Oliveira JBA, Baruffi RLR, Franco Júnior JG. The effects of male age on sperm DNA damage: an evaluation of 2,178 semen samples. *JBRA Assisted Reproduction*. 2019;22(4):323-330.
29. D'Andrea S, Micillo A, Barbonetti A, Giordano AV, Carducci S, Mancini A. Determination of spermatic vein reflux after varicocele repair helps to define the efficacy of treatment in improving sperm parameters of subfertile men. *J Endocrinol Invest*. 2017;40(10):1145-1153.
30. Damsgaard J, Joensen UN, Carlsen E, Erenpreiss J, Blomberg Jensen M, Matulevicius V. Varicocele Is Associated with Impaired Semen Quality and Reproductive Hormone Levels: A Study of 7035 Healthy Young Men from Six European Countries. *European Urology*. 2016;70(6):1019-1029.
31. Darbandi M, Darbandi S, Agarwal A, Baskaran S, Dutta S, Sengupta P. Reactive oxygen species-induced alterations in H19-Igf2 methylation patterns, seminal plasma metabolites, and semen quality. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(2):241-253.
32. Dehghanpour F, Fesahat F, Yazdinejad F, Motamedzadeh L, Talebi AR. Is there any relationship between human sperm parameters and protamine deficiency in different groups of infertile men? *Rev Int Androl*. 2019 ;31(19):e30039
33. Dieamant F, Petersen CG, Mauri AL, Conmar V, Mattila M, Vagnini LD. Semen parameters in men with varicocele: DNA fragmentation, chromatin packaging, mitochondrial membrane potential, and apoptosis. *JBRA Assisted Reproduction*. 2017;21(4):295-301.
34. Dobanovacki D. Varicocele in adolescents. *Med. Pregl*. 2010;63(11-12):741-746.

35. Dorostghoal M, Kazeminejad SR, Shahbazian N, Pourmehdi M, Jabbari A. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia*. 2017;49(10):e12762.
36. Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril*. 1970;21:606-609.
37. Esbert M, Pacheco A, Soares SR, Amorós D, Florensa M, Ballesteros A. High sperm DNA fragmentation delays human embryo kinetics when oocytes from young and healthy donors are microinjected. *Andrology*. 2018;6(5):697-706.
38. Esteves S, Miyaoka R, Roque M, Agarwal A. Outcome of varicocele repair in men with nonobstructive azoospermia: systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl*. 2016;18(2):246-253.
39. Foroozan-Broojeni S, Tavalae M, Lockshin RA, Zakeri Z, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. Comparison of main molecular markers involved in autophagy and apoptosis pathways between spermatozoa of infertile men with varicocele and fertile individuals. *Andrologia*. 2019;51(2):e13177.
40. Forzini T, Alezra E, Demailly M, Lewandowski E, Saint F. Évolution de la prise en charge thérapeutique des varicocèles: analyse des données nationales du codage CCAM (2006–2014). *Progrès en Urologie*. 2016;26(3):139-144.
41. Garolla A, Torino M, Miola P, Caretta N, Pizzol D, Menegazzo M. Twenty-four-hour monitoring of scrotal temperature in obese men and men with a varicocele as a mirror of spermatogenic function. *Hum Reprod*. 2015;30(5):1006-1013.
42. Gaucher J1, Reynoird N, Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S. From meiosis to postmeiotic events: The secrets of histone disappearance. *FEBS J*. 2010 ;277(3):599-604.
43. Ghandehari-Alavijeh R, Tavalae M, Zohrabi D, Foroozan-Broojeni S, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. Hypoxia pathway has more impact than inflammation pathway on etiology of infertile men with varicocele. *Andrologia*. 2019;51(2):e13189.
44. Gökçe A, Davarci M, Yalçinkaya FR, Güven EO, Kaya YS, Helvacı MR. Hereditary behavior of varicocele. *J Androl*. 2010;31(3):288-290.
45. Greco E. Reduction of the Incidence of Sperm DNA Fragmentation by Oral Antioxidant Treatment. *Journal of Andrology*. 2005;26(3):349-353.
46. Greening DJ. Frequent ejaculation. a pilot study of changes in sperm DNA damage and semen parameters using daily ejaculation. *Fertility and Sterility*. 2007;88(1) :19-20.
47. Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*. 1987;236(4804):962-9644.
48. Guercio C, Patil D, Mehta A. Hypogonadism is independently associated with varicocele repair in a contemporary cohort of men in the USA. *Asian J Androl*. 2018; 21(1): 45-49.
49. Guido C, Perrotta I, Panza S, Middea E, Avena P, Santoro M. Human sperm physiology: estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *J Cell Physiol*. 2011;226(12):3403-3412.
50. Hachemi M, Bensaada M, Rouabah A, Zoghmar A, Benbouhedja S, Rouabah L, and Bouchaib M. Effect of Spermatic Nuclear Quality on Live Birth Rates in Intracytoplasmic Sperm Injection. *J Hum Reprod Sci*. 2019;12(2): 122-129.
51. Halpern J, Mittal S, Pereira K, Bhatia S, Ramasamy R. Percutaneous embolization of varicocele: technique, indications, relative contraindications, and complications. *Asian J Androl*. 2016;18(2): 234-238.
52. Hamad MF. Quantification of histones and protamines mRNA transcripts in sperms of infertile couples and their impact on sperm's quality and chromatin integrity. *Reproductive Biology*. 2019;19(1):6-13.

53. Hamilton JAM, Cissen M, Brandes M, Smeenk JMJ, de Bruin JP, Kremer JAM. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. *Human Reproduction*. 2015;30(5):1110-1121.
54. Hassanin AM, Ahmed HH, Kaddah AN. A global view of the pathophysiology of varicocele. *Andrology*. 2018;6(5):654-661.
55. Ibrahim Y, Hotaling J. Sperm Epigenetics and Its Impact on Male Fertility, Pregnancy Loss, and Somatic Health of Future Offsprings. *Semin Reprod Med*. 2018;36(3-04):233-239.
56. Iosa G, Lazzarini D. Hemodynamic classification of varicoceles in men: our experience. *J Ultrasound*. juin 2013;16(2):57-63.
57. Irez T, Dayioglu N, Alagöz M, Karatas S, Güralp O. The use of aniline blue chromatin condensation test on prediction of pregnancy in mild male factor and unexplained male infertility. *Andrologia*. 2018;50(10):e13111.
58. Jarow JP, Coburn M, Sigman M. Incidence of varicoceles in men with primary and secondary infertility. *Urology*. 1996;47(1):73-76.
59. Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clin Exp Reprod Med*. 2019;46(1):14-21.
60. Jensen CFS, Østergren P, Dupree JM, Ohl DA, Sønksen J, Fode M. Varicocele and male infertility. *Nature Reviews Urology*. 2017;14(9):523-533.
61. Kamina P. *Planches d'anatomie*, 2005, éditions Maloine.
62. Kamkar N, Ramezanali F, Sabbaghian M. The relationship between sperm DNA fragmentation, free radicals and antioxidant capacity with idiopathic repeated pregnancy loss. *Reproductive Biology*. 2018;18(4):330-335.
63. Khalili MA, Adib M, Halvaei I, Nabi A. Vitrification of Neat Semen Alters Sperm Parameters and DNA Integrity. *Urol J*. 2014;11(2):1465-1470.
64. Kim GY. What should be done for men with sperm DNA fragmentation? *Clin Exp Reprod Med*. 2018;45(3):101-119.
65. Kim H-S, Kang MJ, Kim SA, Oh SK, Kim H, Ku S-Y. The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clin Exp Reprod Med*. 2013;40(1):23-28.
66. Kipper BH, Trevizan JT, Carreira JT, Carvalho IR, Mingoti GZ, Beletti ME. Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF. *Theriogenology*. 2017;87:154-160.
67. Kohn TP, Kohn JR, Pastuszak AW. Varicocelectomy before assisted reproductive technology: are outcomes improved? *Fertility and Sterility*. 2017;108(3):385-391.
68. Koksal IT, Ishak Y, Usta M, Danisman A, Guntekin E, Bassorgun IC. Varicocele-induced testicular dysfunction may be associated with disruption of blood-testis barrier. *Arch Androl*. 2007;53(1):43-48.
69. Kroese AC, de Lange NM, Collins J, Evers JL. Surgery or embolization for varicoceles in subfertile men. *Cochrane Gynaecology and Fertility Group*. 2009 ;21(1):CD000479.
70. Kumar N, Singh AK. Reactive oxygen species in seminal plasma as a cause of male infertility. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*. 2018;47(10):565-572.
71. Legoupil F. *Planches Anatomiques, Appareil Génital Masculin*. 2013, édition Luoman
72. Lu J-C, Jing J, Chen L, Ge Y-F, Feng R-X, Liang Y-J. Analysis of human sperm DNA fragmentation index (DFI) related factors: a report of 1010 subfertile men in China. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018;16(1):23.

73. Majzoub A, Arafa M, Mahdi M, Agarwal A, Al Said S, Al-Emadi I. Oxidation–reduction potential and sperm DNA fragmentation, and their associations with sperm morphological anomalies amongst fertile and infertile men. *Arab Journal of Urology*. 2018;16(1):87-95.
74. Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek AJ. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(45):17725-17729.
75. Martin-Hidalgo, Bragado, Batista, Oliveira, Alves. Antioxidants and Male Fertility: from Molecular Studies to Clinical Evidence. *Antioxidants*. 2019;8(4):89.
76. Mohammadali Beigi F, Mehrabi S, Javaherforooshzadeh A. Varicocele in brothers of patients with varicocele. *Urol J*. 2007;4(1):33-35.
77. Mohammed E-EM, Mosad E, Zahran AM, Hameed DA, Taha EA, Mohamed MA. Acridine Orange and Flow Cytometry: Which Is Better to Measure the Effect of Varicocele on Sperm DNA Integrity? *Adv Urol*. 2015:e814150.
78. Mongioi LM, Mammino L, Compagnone M, Condorelli RA, Basile A, Alamo A. Effects of Varicocele Treatment on Sperm Conventional Parameters: Surgical Varicocelectomy Versus Sclerotherapy. *Cardiovasc Intervent Radiol*. mars 2019;42(3):396-404.
79. Muratori M, De Geyter C. Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2019;33(1):117-126.
80. Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med*. 2015;21(1):109-122.
81. Nguyen TT, Trieu TS, Tran TO, Luong TLA. Evaluation of sperm DNA fragmentation index, Zinc concentration and seminal parameters from infertile men with varicocele. *Andrologia*. 2019;51(2):e13184.
82. Ni K, Spiess AN, Schuppe HC, Steger K. Protamines ratio (P1/P2) in spermatozoa as biomarker for male infertility. *Andrology*. 2016;4(5):789-799
83. O'Neill CL, Parrella A, Keating D, Cheung S, Rosenwaks Z, Palermo GD. A treatment algorithm for couples with unexplained infertility based on sperm chromatin assessment. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(10):1911-1917.
84. Pacey A. Is sperm DNA fragmentation a useful test that identifies a treatable cause of male infertility? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2018;53:11-19.
85. Pallotti F, Paoli D, Carlini T, Vestri AR, Martino G, Lenzi A. Varicocele and semen quality: a retrospective case–control study of 4230 patients from a single centre. *J Endocrinol Invest*. 2018;41(2):185-192.
86. Panner Selvam MK, Agarwal A. A systematic review on sperm DNA fragmentation in male factor infertility: Laboratory assessment. *Arab Journal of Urology*. 2018;16(1):65-76.
87. Park Y-S, Lee S-H, Choi HW, Lee HS, Lee JS, Seo JT. Abnormal Human Sperm Parameters Contribute to Sperm DNA Fragmentation in Men with Varicocele. *World J Mens Health*. 2018;36(3):239.
88. Pokhrel G, Yihao S, Wangcheng W, Khatiwada SU, Zhongyang S, Jianqiao Y. The impact of sociodemographic characteristics, lifestyle, work exposure and medical history on semen parameters in young Chinese men: A cross-sectional study. *Andrologia*. 2019;51(8):e13324.
89. Pourmasumi S, Khoradmehr A, Rahiminia T, Sabeti P, Talebi AR, Ghasemzadeh J. Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men. *J Reprod Infertil*. 2019;20(2):95-101.

90. Pourmasumi S, Sabeti P, Rahiminia T. The etiologies of sperm DNA abnormalities in male infertility: An assessment and review. *IJRM*. 2017;15(6):331-344.
91. Prasivoravong J, Marcelli F, Lemaître L, Pigny P, Ramdane N, Peers M-C. Beneficial effects of varicocele embolization on semen parameters. *Basic Clin Androl*. 2014;24(1):9.
92. Rocher L, Gennisson J-L, Barranger J, Rachas A, Criton A, Izard V. Ultrasensitive Doppler as a tool for the diagnosis of testicular ischemia during the Valsalva maneuver: a new way to explore varicoceles? *Acta Radiol*. 2019;60(8):1048-1056.
93. Roque M, Esteves SC. Effect of varicocele repair on sperm DNA fragmentation: a review. *Int Urol Nephrol*. 2018;50(4):583-603.
94. Sadek A, Almohamdy ASA, Zaki A, Aref M, Ibrahim SM, Mostafa T. Sperm chromatin condensation in infertile men with varicocele before and after surgical repair. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1705-1708.
95. Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res*. 1999;251(2):350-355.
96. Samplaski MK, Lo KC, Grober ED, Zini A, Jarvi KA. Varicocelectomy to “upgrade” semen quality to allow couples to use less invasive forms of assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility*. 2017;108(4):609-612.
97. Samplaski MK, Yu C, Kattan MW, Lo KC, Grober ED, Zini A. Nomograms for predicting changes in semen parameters in infertile men after varicocele repair. *Fertility and Sterility*. juill 2014;102(1):68-74.
98. Santana VP, Miranda-Furtado CL, de Oliveira-Gennaro FG, dos Reis RM. Genetics and epigenetics of varicocele pathophysiology: an overview. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(7):839-847.
99. Santana VP, Miranda-Furtado CL, Pedroso DCC, Eiras MC, Vasconcelos MAC, Ramos ES. The relationship among sperm global DNA methylation, telomere length, and DNA fragmentation in varicocele: a cross-sectional study of 20 cases. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2019;65(2):95-104.
100. Santi D, Spaggiari G, Simoni M. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management – meta-analyses. *Reproductive BioMedicine Online*. 2018;37(3):315-326.
101. Sati L, Ovari L, Bennett D, Simon SD, Demir R, Huszar G. Double probing of human spermatozoa for persistent histones, surplus cytoplasm, apoptosis and DNA fragmentation. *Reproductive BioMedicine Online*. 2008;16(4):570-579.
102. Saylan A, Erimsah S. High quality human sperm selection for IVF: A study on sperm chromatin condensation. *Acta Histochemica*. 2019;121(7):798-803
103. Schlegel PN, Kaufmann J. Role of varicocelectomy in men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2004;81(6):1585-1588.
104. Sedaghatpour D, Berookhim BM. The Role of Varicocele in Male Factor Subfertility. *Curr Urol Rep*. 2017;18(9):73.
105. Sepúlveda L, Coimbra D, Lourenço M, Santos L, Oliveira C, Coutinho S. Varicocele treatment in patients up to 35 years old: A multicentric retrospective study comparing 3 different techniques. *Arch Esp Urol*. 2018;71(6):543-548.
106. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human Reproduction*. 2005;20(12):3446-3451.
107. Shiraishi K, Matsuyama H. Effects of medical comorbidity on male infertility and comorbidity treatment on spermatogenesis. *Fertility and Sterility*. 2018;110(6):1006-1011.

108. Sigman M. Testicular versus ejaculated sperm should be used for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in cases of infertility associated with sperm DNA fragmentation | Opinion: No. *Int braz j urol.* 2018;44(4):676-679.
109. Smith RM, Mackenzie-Proctor R, Yazdani A, Stankiewicz MT, Jordan V, Showell MG. Antioxidants for male subfertility. Cochrane Gynaecology and Fertility Group, éditeur. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2011;19;(1):CD007411.
110. Song Y, Xu Y, Liang Z, Yang Y, Liu X. Lower body mass index and higher height are correlated with increased varicocele risk. *Andrologia.* 2019;e13391.
111. Sotolongo B, Huang TT, Isenberger E, Ward WS. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl.* 2005;26(2):272-280.
112. Subramanian V, Ravichandran A, Thiagarajan N, Govindarajan M, Dhandayuthapani S, Suresh S. Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility. *Clin Exp Reprod Med.* 2018;45(2):88-93.
113. Sun T-C, Zhang Y, Li H-T, Liu X-M, Yi D-X, Tian L. Sperm DNA fragmentation index, as measured by sperm chromatin dispersion, might not predict assisted reproductive outcome. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2018;57(4):493-498.
114. Tahamtan S, Tavalae M, Izadi T, Barikrow N, Zakeri Z, Lockshin RA. Reduced sperm telomere length in individuals with varicocele is associated with reduced genomic integrity. *Sci Rep.* déc 2019;9(1):e4336.
115. Talebi AR, Moein MR, Tabibnejad N, Ghasemzadeh J. Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia.* 2008;40(4):245-251.
116. Tulay I, Dayioglu N, Alagöz M, Karatas S and Güralp O. The use of aniline blue chromatin condensation test on prediction of pregnancy in mild male factor and unexplained male infertility. *Andrologia.* 2018;50(10):e13111.
117. Vakalopoulos I, Kampantais S, Lymperi S, Grivas N, Ioannidis A, Mykoniatis I. Should we expand the indications for varicocele treatment? *Transl Androl Urol.* 2017;6(5):931-942.
118. World Health Organization. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertility and Sterility.* 1992;57(6):1289-1293.
119. Zini A, Azhar R, Baazeem A, Gabriel MS. Effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm chromatin and DNA integrity: a prospective trial. *International Journal of Andrology.* 2011;34(1):14-19.
120. Zini A, Boman J, Jarvi K, Baazeem A. Varicocelectomy for Infertile Couples with Advanced Paternal Age. *Urology.* 2008;72(1):109-113.



Nom, prénom du candidat : BOSQUET Dorian

CONCLUSIONS

La varicocèle est une anomalie vasculaire fréquemment retrouvée lors d'une infertilité. La physiopathologie de la varicocèle a un impact négatif sur l'environnement testiculaire, et donc probablement sur le bon déroulement de la spermatogénèse. Chez les patients hypofertiles et porteurs d'une varicocèle, un défaut de maturation de la chromatine spermatique est fréquemment incriminé dans la littérature. Le but de ce travail préliminaire a été d'évaluer l'impact de la varicocèle sur la qualité du noyau spermatique. Pendant une période de 4 mois, une cohorte de 12 hommes hypofertiles porteurs d'une varicocèle a été constituée. Chez ces patients, il a été réalisé les examens suivants : un spermogramme-spermocytogramme, un test de migration-survie (TMS). La qualité du noyau spermatique a été évaluée par la mesure de la fragmentation de l'ADN spermatique quantifiée par la technique TUNEL et la mesure la condensation chromatinienne spermatique quantifiée par la coloration au bleu d'aniline. Ces deux mesures ont permis de calculer le taux de spermatozoïdes ayant leur ADN fragmenté (DFI : DNA fragmentation index) et le taux de spermatozoïdes ayant une chromatine décondensée (SDI : Sperm Decondensation Index). Il a donc été possible d'étudier les liaisons entre les paramètres issus du spermogramme-spermocytogramme et du TMS avec le DFI et le SDI.

Chez ces 12 patients, le pourcentage de spermatozoïdes à mobilité progressive est modérément abaissé : $29,2\% \pm 13,3\%$ pour une valeur de référence de $32,0\%$, il en est de même pour le pourcentage de formes typiques : $12,1\% \pm 9,8\%$ pour une valeur de référence de 20% . La valeur moyenne du DFI ne semble pas altérée : $13,8\% \pm 10,2\%$ pour une valeur de référence de 20% . Le SDI moyen est augmenté : $41,4\% \pm 23,8\%$, pour une valeur de référence de 20% . Pour les patients dont le DFI est supérieur à 20% , il existe une baisse de la mobilité progressive des spermatozoïdes : $20,7\% \pm 7,1\%$ vs $33,7\% \pm 13,6\%$. Pour les patients dont le SDI est inférieur à 30% , il existe une baisse du pourcentage de spermatozoïdes de formes typiques après un gradient de sélection : $7,2\% \pm 2,7\%$ vs $20,3 \pm 12,7\%$. Nous mettons en

évidence qu'il n'y a pas de corrélation significative entre le SDI et le DFI (r de Spearman = 0,07 avec $p = 0,829$).

L'absence de corrélation entre le DFI et le SDI va dans le sens où le SDI apporte des informations complémentaires au DFI, en ce qui concerne la qualité du noyau spermatique. Ceci nous permet de comprendre qu'un défaut de maturité de la chromatine spermatique peut être présent sans que l'ADN soit anormalement fragmenté. En effet, la qualité de compaction chromatiniennne contribue à la qualité finale du génome fourni à l'ovocyte, pour le bon déroulement de la cinétique du développement embryonnaire. Il est donc probable d'obtenir, dans certains cas, des anomalies de développements embryonnaire alors que le DFI était normal. Il est prévu de réaliser le traitement par scléro-embolisations des varicocèles. Nous mesurerons l'évolution des paramètres spermatiques et des marqueurs d'intégrité chromatiniennne à 3, 6 et 12 mois post-embolisation. Ces mesures permettraient d'objectiver l'impact de la scléro-embolisation de la varicocèle sur les caractéristiques spermatiques. De plus les résultats des tentatives de fécondation *in vitro* réalisées après embolisation des patients inclus pourraient permettre de juger de façon plus globale de l'intérêt de la scléro-embolisation sur les tentatives d'AMP. En effet la littérature reste discordante à l'heure actuelle sur l'intérêt de traiter la varicocèle, lorsqu'elle prend en compte la qualité de la tentative, le taux de grossesse et de naissance vivante. Cette étude préliminaire permet donc de valider ce projet et de comprendre l'intérêt de le poursuivre et de le compléter.

Le Président de jury,

Nom et Prénom

Signature **LEJEUNE Hervé**

GROUPEMENT HOSPITALIER EST
Hôpital Femme Mère Enfant
Pr H. LEJEUNE
MDR - RJ - UF 34262
N° RPPS 10003048781
59, Bd Pinel - 69677 BRON cedex

VU,

Le Doyen de la Faculté de Médecine et
de Maïeutique Lyon-Sud Charles Mérieux



Professeur Carole BURILLON

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 30/09/2019

Le Serment d'Hippocrate

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans discrimination.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance.

Je donnerai mes soins à l'indigent et je n'exigerai pas un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement la vie ni ne provoquerai délibérément la mort.

Je préserverai l'indépendance nécessaire et je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je perfectionnerai mes connaissances pour assurer au mieux ma mission.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé si j'y manque.

BOSQUET Dorian

Nombres pages : 57, illustrations : 12, tableaux : 8

Th. Méd. : Lyon 2019 ; n°301

Objectif : La moitié des cas d'infertilité du couple pourraient être imputés à des facteurs masculins. Chez cette population d'hommes hypofertiles, la varicocèle serait l'élément clinique le plus souvent rencontré, environ une fois sur cinq. Il semblerait que la varicocèle ait un impact négatif sur la spermatogénèse, particulièrement sur la maturation chromatinienne des spermatozoïdes. Le projet de ce travail est d'évaluer les paramètres spermatiques de routine et des marqueurs d'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes avant et après embolisation de la varicocèle, afin de valider l'intérêt du traitement de la varicocèle. Dans cette thèse, nous effectuerons la première étape du travail, qui consiste à inclure les patients hypofertiles porteurs d'une varicocèle et à mesurer les paramètres spermatiques et chromatinien avant l'embolisation de leur varicocèle.

Méthode : Des patients présentant une varicocèle clinique ont été inclus sur une période de 4 mois. Ils bénéficient d'une analyse spermatique de routine avec étude de la fragmentation de l'ADN spermatique par la technique TUNEL© et de la condensation chromatinienne spermatique par la coloration au bleu d'aniline, effectués au moment du diagnostic de la varicocèle.

Résultat : Une première série de douze patients a été incluse, notre population est caractérisée par des paramètres spermatiques modérément altérés avec un DFI (DNA fragmentation index) moyen normal ($13,8\% \pm 10,2\%$) et un SDI (Sperm Decondensation Index) moyen augmenté ($41,4\% \pm 23,8\%$). Dans cette cohorte, nous avons montré que le DFI était corrélé positivement au volume spermatique ($r = 0.634$, $p = 0.027$), négativement à la mobilité totale spermatique initiale ($r = -0.655$, $p = 0.021$), et négativement au pourcentage de spermatozoïdes mobiles totaux et progressifs obtenus après le TMS (respectivement $r = -0.673$, $p = 0.023$ et $r = -0.882$, $p = 0.001$). Le SDI est corrélé positivement au pourcentage de spermatozoïdes avec une forme typique obtenus après traitement par gradient de sélection ($r = 0.639$, $p = 0.038$). Il n'y a pas de corrélation entre le DFI et le SDI.

Conclusion : Nos premiers résultats montrent l'existence de liens entre le DFI, le SDI avec des paramètres spermatiques chez les patients porteurs d'une varicocèle. Ces premiers résultats permettent donc de valider nos méthodes et la poursuite de notre projet. Nous devons agrandir la taille de la cohorte. Nous pouvons poursuivre ce travail en réalisant l'embolisation de la varicocèle et les mesures à 3 mois de ces mêmes paramètres.

MOTS CLEFS

- Varicocèle
- Infertilité masculine
- Fragmentation de l'ADN
- Condensation de la chromatine
- Spermatozoïdes

JURY

M. le Président : Professeur Hervé LEJEUNE

M le Professeur Jean-François GUERIN

Mme le Professeur Christine VINCIGUERRA

M. le Directeur : Docteur Mehdi BENCHAIB

Mme le Docteur Jacqueline LORNAGE

Mme le Professeur Sylviane HENNEBICQ (invitée)

DATE DE SOUTENANCE

Le 23 octobre 2019

ADRESSE DE L'AUTEUR

176 RD 386 69560 Saint Romain en Gal