

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention de grade de Docteur en Sciences Biologiques et Santé Cytogénétique

Formation Doctorale: Biologie, Santé et Environnement

Spécialité: Sciences Biologiques et Santé Cytogénétique

Sous le thème

Etude cytogénétique des couples Marocains souffrant d'avortements spontanés précoces à répétition

Présentée par :

Hanane HOUMAIID

Soutenue le: 28 Décembre 2021

A l'Institut Supérieur des Sciences de la Santé Settat devant le jury composé de :

Pr. Abdelkhalid ESSAMADI	PES	Université Hassan 1 ^{er} Settat	Président
Pr. Nouredine HARICH	PES	Faculté des Sciences Université Chouaib Doukali- El Jadida	Rapporteur
Pr. Ibtissam YOULYOUZ	PESH	Institut supérieur des Sciences de la santé Université Hassan 1 ^{er} -Settat	Rapporteuse
Pr. Milouda CHEBABA	PESH	Institut supérieur des Sciences de la santé Université Hassan 1 ^{er} -Settat	Examinatrice
Pr. Naima HAMIDALLAH	PES	Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan 1 ^{er} -Settat	Examinatrice
Pr. Abderraouf HILALI	PES	Institut supérieur des Sciences de la santé Université Hassan 1 ^{er} -Settat	Directeur de thèse

Année Universitaire: 2020/2021

Résumé

L'avortement spontané est un problème courant au cours de la grossesse, il affecte presque 25 à 50% des femmes qui tentent à procréer. Il a été évalué qu'entre 30% à 60% de toutes les grossesses dans l'espèce humaine échouent avant d'achever leur développement intra-utérin et que plus de 60% sont cytogénétiquement anormaux. La plupart des avortements ont lieu après la première semaine de gestation. Bien que la plupart des avortements sont sporadiques, 1 à 3% des couples présentent des avortements à répétition qui se définissent par deux avortements ou plus. Plusieurs pathologies ont été considérées comme causes des avortements, les anomalies chromosomiques représentent approximativement 50 à 60% des cas. Le mode de vie moderne, la sédentarité, et l'exposition aux toxines exogènes et endogènes conduisent à une augmentation des dommages de l'ADN. Ceci peut avoir un impact sur les ovocytes, les spermatozoïdes et/ou l'embryon en développement conduisant à l'infertilité, à des fausses couches et ou à des malformations congénitales. Dans le présent travail la génotoxicité et la cytotoxicité ont été évaluées in vitro sur des lymphocytes du sang périphérique humains de 30 couples colligés pour aux moins deux fausses couches, est-ce par l'étude des biomarqueurs cytogénétiques : la fréquence de Micronoyaux (MN), l'Indice de Prolifération cellulaire (IP), les Aberrations Chromosomiques (AC), l'Indice Mitotique (IM), l'Indice de Stimulation (IS), les Echanges entre les Chromatides Sœurs (ECS) et l'indice de Réplication (IR). Les résultats ont été comparés à ceux des témoins et ont affichés une instabilité chromosomique très marquée chez ces couples. La prévalence des aberrations chromosomiques est estimée à 53,34%, elles sont plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes (R= 1,25). Le taux des AC ($0,0066 \pm 0,0016$) ($p < 0,05$), La fréquence de MN ($0,0048 \pm 0,0003$) ($p < 0,001$), et le taux des ECS des couples ($1,8567 \pm 0,1742$) ($p < 0,001$) sont plus élevés en comparaison avec les témoins. Ainsi, ces tests peuvent constituer des biomarqueurs, prédictifs de la répétition des accidents abortifs ; ils peuvent constituer ainsi des facteurs pronostiques, concernant le résultat obstétrical. Les résultats de l'étude soulignent l'importance de l'exploration cytogénétique des couples aux antécédents de pertes fœtales spontanées à répétition, est ce, dès le second accident. À la lumière de ces données, un conseil génétique adapté est proposé. Les facteurs nutritionnels et environnementaux doivent également être pris en compte, ceci à toute son importance puisqu'il s'agit de facteurs modulables et permettant ainsi d'améliorer la prise en charge des couples souffrant de FCR, grâce à l'établissement de recommandations de régime alimentaire et de style de vie sans omettre le soutien psychologique.

Mots clés : avortements spontanés précoces à répétition, dommages de l'ADN, conseil génétique

"ومن أحياءها
فكأنما أحياء
الناس جميعا"

صدق الله العظيم

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à monsieur **le Professeur Jamal Naja**, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat pour ses efforts déployés afin d'assurer les meilleures conditions pour une formation de haute qualité.

Je tiens à remercier, très sincèrement, mon encadrant **le Professeur Abderraouf Hilali**, directeur de l'Institut Supérieur des Sciences de la Santé de Settat, responsable du Laboratoire de Cytogénétique. J'ai eu l'honneur et la chance de bénéficier de ses connaissances et compétences, de ses précieux conseils et de son suivi tout au long de mon parcours. Son sens élevé du devoir, son dévouement, le fait d'être toujours montré à l'écoute ainsi que sa rigueur scientifique, et ses grandes qualités humaines imposent l'estime et le respect. Je vous remercie infiniment.

Je remercie vivement **les Professeurs Bouchaib Bencharki et Abdelkhalid Essamadi**, Professeurs à la Faculté des Sciences et Techniques de Settat, pour tous ses efforts pour réaliser ce modeste travail.

Je remercie **le Professeur Ahmed Fahli**, Vice président de l'Université Hassan 1^{er} qui ne préserve aucun effort pour accompagner les doctorants durant leur formation.

Mes remerciements s'adressent particulièrement à **Docteur Hayat Talbi**, pour son aide et son soutien. Je la remercie énormément pour le temps qu'elle a consacré à la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à **Professeur Loubna Amahdar**, enseignante à l'Institut Supérieur des Sciences de la Santé de Settat, et à **monsieur Hamid Farhane** pour leur précieuse contribution. Je remercie également **Dr Fatine Hadrya** pour sa contribution à la réalisation de ce travail.

Je tiens également à remercier très chaleureusement **Dr Chadli El Bekay**, ancien chef de service de cytogénétique à l'Institut Pasteur de Casablanca pour son accueil, son aide, son attention et sa gentillesse tout au long de mon stage au sein de son service.

Je tiens à remercier vivement les membres de jury qui accepteront de juger ce travail. Je tiens à les remercier, pour leur lecture attentive, ainsi que pour les remarques qu'ils m'adresseront lors de la soutenance.

J'adresse également des remerciements à tous les enseignants et personnels de la faculté des sciences et Techniques de Settat et à ceux de l'Institut Supérieur des Sciences de la Santé. De peur d'en avoir oublié, je souhaite remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ce parcours universitaire.

Que ce modeste travail soit le témoignage de mon profond respect et de ma profonde gratitude à l'égard de tous mes maîtres.

LISTE DES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

Articles publiés

Chromosomal Abnormalities in 238 Couples with Recurrent Miscarriages in Morocco. Hanane Houmaid, Chadli El Bekkay, Sanaa Nassereddine, Hayat Talbi, Loubna Amehdare, Abderraouf Hilali. Open Journal of Genetics, 2018, 8, 15-22.

Nutrition et fausses couches spontanées. Nutrition and miscarriages. الإجهاض وعلاقته بالتغذية. H. Houmaid, H.Talbi, A.Hilali. Annales des sciences de la santé, 2016, N° 8, Vol. 1: 28-36.

Communications nationales et internationales

Risque génotoxique et ovocytes: principes de toxicologie génétique et applications. Hanane Houmaid, Hamid Farhane, Hayat Talbi, Loubna Amahdare, Abderraouf Hilali. Congrès international de L'industrie, l'environnement et la santé. Du 05 au 08 octobre 2020 à Mohammedia.

Intérêt de la cytogénétique des gamètes humains. Hanane Houmaid, Hayat Talbi, Hamid Farhane, Loubna Amahdare, Abderraouf Hilali. Congrès international de L'industrie, l'environnement et la santé. Du 05 au 08 octobre 2020 à Mohammedia.

Intérêt de la cytogénétique des gamètes humains. H.Houmaid, H.Talbi, H.Farhane, L.Amahdar, A.Hilali. La 6^{ème} Journée Scientifique Nationale de l'Environnement & de la Santé (6JSNES) qui s'est déroulée le 17 Décembre 2020.

Impact des facteurs environnementaux physiques et chimiques sur le déroulement et les issues de grossesse. H.Houmaid, H.Talbi, H.Farhane, L.Amahdar, A.Hilali. Les journées scientifiques de PEDAGOGIE-RECHERCHE-SANTE. Les 26-27 Avril 2018, à la Faculté de Médecine Dentaire de Casablanca.

Intérêt de la cytogénétique des gamètes humains. H.Houmaid, H.Talbi, H.Farhane, L.Amahdar, H.Farhane, A.Hilali. Les journées scientifiques de PEDAGOGIE-RECHERCHE-SANTE. Les 26-27 Avril 2018, à la Faculté de Médecine Dentaire de Casablanca.

Les facteurs masculins et fausses couches à répétition. Houmaid. H, H.Talbi, L.Amahdar, A.Hilali. Deuxièmes journées nationales de la recherche en sciences de la sante jonares2. Les 07-08 décembre 2016 à l'institut supérieur des sciences de la santé. Université hassan 1^{er}, settat.

Fausse couches spontanées et obésité. Houmaid. H, H.Talbi, L.Amahdar, A.Hilali. Deuxièmes journées nationales de la recherche en sciences de la sante jonares2. Les 07-08 décembre 2016 à l'institut supérieur des sciences de la santé. Université hassan 1^{er}, settat.

Place et apports du caryotype en infertilité masculine. H.Houmaid, H.Talbi, A.Hilali. Colloque International : LES SCIENCES AU SERVICE DE LA SANTE. Meknès les 04 et 05 Mai 2016.

Recurrent miscarriage: genetic factors. H.Houmaid, Y.El Aoudi, H.Talbi, H. Sbayou L.Amahdar, A.Hilali. Premières journées nationales de la recherche en sciences de la sante : sous le thème pratiquer les savoirs infirmiers pour promouvoir la santé des populations. Les 30 et 31 octobre 2015 à l'ispits de tétouan – maroc. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy.

H.houmaid, H.talbi , Y.El Aoudi, H. Sbayou, L.amahdar, A.Hilali. Premières journées nationales de la recherche en sciences de la sante : sous le thème pratiquer les savoirs infirmiers pour promouvoir la santé des populations. Les 30 et 31 octobre 2015 a l'ispits de tétouan – maroc.

Nutrition et fausses couches spontanées.H.Houmaid, H.Talbi, Y.El Aoudi, H. Sbayou, L.Amahdar, A.Hilali. Premières journées nationales de la recherche en sciences de la sante : sous le thème pratiquer les savoirs infirmiers pour promouvoir la santé des populations. Les 30 et 31 octobre 2015 a l'ispits de tétouan – maroc.

Les fausses couches et anomalies chromosomiques parentales. H.Houmaid, H.Talbi, Y.El Aoudi, L.Amahdar, A.Hilali. 3ème édition de la journée des doctorants à la Faculté des Sciences et Techniques de Settat-Maroc : 16 juin 2015, université hassan premier, Fst de Settat.

Genetic aspects of reproductive failure. H.Houmaid, H.Talbi, H.Sbayou, Y.El Aoudia, L.Amahdar, A.Hilali. Congres international « de la mortalite néonatale et infantile », les 23, 24, 25 juin a marrakech 2014.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABP	Androgen binding protein
AC	Aberration chromosomique
ACP	Analyse en composante principale
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFP	Alpha-fœtoprotéine
AIHW	Australian Institute of Health and Welfare
AMH	Hormone anti- mullérienne
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANTCDS	Antécédents
ARN	Acide ribonucléique
AS	Avortement spontané
ASP	Avortement spontané précoce
ASPR	Avortement spontané précoce à répétition
AZF	Azoospermia factor
BrdU	Bromodésoxyuridine
CBMN	Cytokinesis-block micronucleus
C dic	Chromosome dicentrique
CE	Cassures extrêmes
CIV	Communication interventriculaire
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CO	Contraception orale
CT	Cassures chromatidiques
CS	Cassure chromosomique
Del	Délétion
DDR	Date des dernières Règles
DDR	Inversion direct des dommages
DPG	Diagnostic génétique préimplantatoire
DI	Délai intergénéésique
DPI	Diagnostic préimplantatoire
DPN	Diagnostic prénatale
DUP	Disomie uniparentale
dup	Duplication
ECS	Echanges entre les chromatides sœurs
EGF	Epidermal growth factor
ESHRE	Société Européenne de Reproduction Humaine et d'Embryologie
EV	Enfant vivant
FC	Fausse couche
FCR	Fausses couches à répétition
FDR	Facteur de risque
FISH	Fluorescence In Situ par Hybridation
FIV	Fécondation in vitro
Frag	Fragments
FSH	Follicle-simulating hormone
g	Gramme
G	Grossissement
GEU	Grossesse extra-utérine
GMPC	Guanosine monophosphate cyclique
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GP	Grossesse perdue
HCG	Hormone chorionique gonadotrope
HDL	Lipoprotéine de haute densité

HLA	Antigènes des leucocytes humains (human leukocyte antigen)
HPV	Papilloma herpès virus
HUMN	Human MicroNucleus
ICX	Inactivation des chromosomes X
IGF I	Insulin-like growth factor-1
IL1	Interleukine 1
IM	Indice Mitotique
IMC	Indice de Masse Corporelle
IMG	Interruption médicale de grossesse
IMO	Inhibiteur de la méiose ovocytaire
Ins	Insertion
Inv	Inversion
IP	Indice prolifération
IR	Indice Réplication
IS	Indice Stimulation
Is	Isochromosome
IST	Infection sexuellement transmissible
ITGB1	Integrin Subunit Beta 1
KCL	Chlorure de potassium
Lac	Lacune
LH	Luteinizing hormone
Mb	Mégabase
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Milimètre
Mn	Micronoyau
MNX	Micronoyaux
MCI	Masse cellulaire interne
MFIU	Mort fœtal in utéro
MPF	M-phase promoting factor
MTHFR	Méthylène tétrahydrofolate réductase
MUC1	Cell surface associated 1
NFS	Numération formule sanguine
NK	Natural killer
NOS	Nitric Oxide Synthase
NOS	Espèce réactive d'Azote
NPPC	Natriuretic peptide type C
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDE3A	Phosphodiesterase 3A
p	Bras court
PE	Pré-éclampsie
pH	Potentiel Hydrogène
PHA	Phytohémagglutinine
PLA	Antigène plaquettaire
PMA	Procréation médicale assistée
Polyp	Polyplœidie
PP 14	Pacental protein 14
q	Bras long
r	Chromosome en anneau
RCC	Réarrangements chromosomiques complexes
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RDB	Ruptures double brin
RCOG	Royal College of Obstetricians and gynecologists
RPMI	Roswell Parck Memoreil Institute

ROS	Espèce Reactive d'oxygène
SA	Semaines Aménorrhées
SAPL	Syndrome des anticorps antiphospholipides
SCGS	Électrophorèse sur gel mono-cellulaire (single cell gel electrophoresis)
SCO2	Cytochrome c oxidase assembly
SO	Stress oxydatif
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSC	Standard Saline Citrate
SSR	Réparation simple brin
TGF α	Transforming growth factor alpha
TGF β	Transforming growth factor beta
t	Température
tr	Tours
Trav occa	Travaux occasionnels
TS	Translocations sautantes
TSH	Thyroid-stimulating hormone
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UI	Unité internationale
VGEF	Facteur de croissance endothélial vasculaire A
XRCC1	X-Ray Repair Cross Complementing 1
μm	Micromètre
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celsius

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Appareil de reproduction féminin	5
Figure 2: Shéma de l'ovaire représentant le follicule et l'ovocyte en développement dans le cortex ovarien.	6
Figure 3: Les différents stades de maturation ovocytaire	7
Figure 4: La folliculogénèse dans l'ovaire humain	9
Figure 5: Coupe sagittale de l'appareil génital masculin	13
Figure 6: Le testicule humain et son épидидyme avec à gauche une représentation schématique d'un spermatozoïde mature	14
Figure 7: Epithélium séminifère humain et développement des cellules germinales.....	15
Figure 8: Représentation schématique de la mitose et la méiose des cellules humaines.....	16
Figure 9: Différenciation d'une cellule germinale diploïde humaine en un spermatozoïde entièrement fonctionnel	17
Figure 10: Apposition et adhésion des blastocystes	21
Figure 11: Implantation du blastocyste	22
Figure 12: Foetus au début de son développement intra-utérin.....	24
Figure 13: Le bâtonnet-teste de grossesse urinaire.....	25
Figure 14: Image échographique d'un foetus au premier trimestre de grossesse.....	26
Figure 15: Schéma du cycle cellulaire	41
Figure 16: Caryotype d'un individu de l'espèce humaine de sexe féminin (à gauche) et du sexe masculin (à droite)	50
Figure 17: Principe du test des Micronoyaux sur les cellules somatiques.....	52
Figure 18: Carnet de santé de la femme	63
Figure 19: Les tubes de culture cellulaire des lymphocytes du sang périphérique des couples.....	65
Figure 20: Microscope photonique.....	66
Figure 21: Cellules Mono (a), bi (d), tri (b), tétranuclées (c).....	68
Figure 22: Cellule binucléée normale (a) et binucléée avec un micronoyau (b)	68
Figure 23: Champ de vision au microscope permettant le calcul de l'indice mitotique	69
Figure 24: Métaphase en deuxième division avec échange entre les chromatides sœurs	69
Figure 25: Origine géographique des couples étudiés	72
Figure 26: Répartition de l'échantillon selon l'âge maternel.....	72
Figure 27: Répartition de l'échantillon selon l'âge paternel.....	73
Figure 28: Répartition selon le niveau intellectuel.....	73
Figure 29: Répartition des femmes selon leurs occupations.....	73
Figure 30: Répartition des hommes selon leurs occupations.....	73
Figure 31: Répartition des couples selon la consanguinité	73
Figure 32: Répartition des femmes selon l'IMC.....	74
Figure 33: Répartition des femmes selon leur ATCDS pathologiques.....	75
Figure 34: Répartition des femmes selon l'âge à la ménarche	75
Figure 35: Répartition de l'échantillon selon la gestité	76
Figure 36: Répartition de l'échantillon selon la parité	76
Figure 37: Répartition des grossesses selon leurs issues	77
Figure 38: Répartition de l'échantillon selon le nombre d'enfants vivants	77
Figure 39: Distribution de l'échantillon selon le nombre de FC	78
Figure 40: Distribution des FC selon l'âge gestationnel.....	78
Figure 41: Nombre de fausses couches par rapport à l'ordre des grossesses	79
Figure 42: La prise en charge des fausses couches	79
Figure 43: Consanguinité et fausse couche.....	80
Figure 44: Age à la ménarche et fausse couche.....	80
Figure 45: Age maternel et fausse couche.....	80
Figure 46: Age paternel et fausse couche	80
Figure 47: Gestité des couples et fausse couche.....	80
Figure 48: Parité des couple et fausse couche.....	80
Figure 49: Grossesses perdues en périnatale et FC	81
Figure 50: Nombre d'enfants vivants et fausses couches	81
Figure 50: Age gestationnel et fausse couche	81
Figure 51: Variation de l'IP de chaque couple en comparaison à la moyenne des témoins.....	83
Figure 52: Variation de la fréquence des MNX de chaque couple en comparaison à la moyenne des témoins	84
Figure 53: Variation de l'IS de chaque couple en comparaison à la moyenne des témoins	84
Figure 54: Variation de l'IM des couples en comparaison à la moyenne des témoins.....	85

Figure 55: Variation des taux des AC des couples en comparaison à la moyenne des témoins	85
Figure 56: Les différentes anomalies chromosomiques des couples	86
Figure 57: Métaphase normales observées sous microscope pour le test des Aberrations chromosomiques (Gx100)	86
Figure 58: Métaphases observées sous microscope montrant des anomalies chromosomiques: cassure, fragment, lacune (a) et polyploïdie (b), (Gx1000).....	86
Figure 59: Variation des taux des échanges entre les chromatides soeurs en comparaison à la moyenne des témoins	87
Figure 60: Métaphase observées sous microscope en deuxième division cellulaire avec anomalie chromosomique (polyploïdie) analysée par le test d'ECS (Gx1000)	87
Figure 61: Variation de l'IR des couples en comparaison à la moyenne des témoins.....	88
Figure 62: Valeur moyenne de l'IP en fonction du sexe.....	89
Figure 63: Valeur moyenne des MNX en fonction du sexe	89
Figure 64: Valeur moyenne de l'IS des deux sexes	89
Figure 65: Valeur moyenne de l'IM des deux sexes	89
Figure 66: Valeur moyenne des AC des deux sexes	90
Figure 67: Valeur moyenne de l'IR des deux sexes	90
Figure 68: Valeur moyenne des ECS des deux sexes.....	90
Figure 69: Valeur moyenne de l'IP et âge maternel	92
Figure 70: Valeur moyenne de la fréquence MN et âge maternel.....	92
Figure 71: Valeur moyenne de l'IS et âge maternel	92
Figure 72: Valeur moyenne de l'IM et âge maternel	92
Figure 73: Valeur moyenne des AC des deux classes d'âge maternel.....	93
Figure 74: Valeur moyenne de l'IR et âge maternel	93
Figure 75: Valeur moyenne des ECS et âge maternel	93
Figure 76: Valeur moyenne de l'IP et âge paternel	95
Figure 77: Valeur moyenne des MNX et âge paternel	95
Figure 78: Valeur moyenne de l'IS et âge paternel	95
Figure 79: Valeur moyenne de l'IM et âge paternel.....	95
Figure 80: Valeur moyenne du taux des AC et âge paternel	96
Figure 81: Valeur moyenne de l'IR et âge paternel	96
Figure 82: Valeur moyenne des ECS et âge paternel	96
Figure 83: Valeur moyenne de l'IP et gestité.....	98
Figure 84: Valeur moyenne de la fréquence des MNX et gestité	98
Figure 85: Valeur moyenne de l'IS et gestité	98
Figure 86: Valeur moyenne de l'IM et gestité	98
Figure 87: Valeur moyenne du taux des AC et gestité	99
Figure 88: Valeur moyenne de l'IR et gestité	99
Figure 89: Valeur moyenne du taux des ECS et gestité.....	99
Figure 90: Valeur moyenne de l'IP et parité.....	101
Figure 91: Valeur moyenne de la fréquence des MNX et parité	101
Figure 92: Valeur moyenne de l'IS et parité.....	101
Figure 93: Valeur moyenne de l'IM et parité.....	101
Figure 94: Valeur moyenne du taux des AC et parité.....	102
Figure 95: Valeur moyenne de l'IR et parité.....	102
Figure 96: Valeur moyenne du taux des ECS et parité	102
Figure 97: Valeur moyenne de l'IP et nombre de FC.....	104
Figure 98: Valeur moyenne de la fréquence des MNX et nombre de FC.....	104
Figure 99: Valeur moyenne de l'IS et nombre de FC	104
Figure 100: Valeur moyenne de l'IM et nombre de FC	104
Figure 101: Valeur moyenne du taux des AC et nombre de FC	105
Figure 102: Valeur moyenne de l'IR et nombre de FC.....	105
Figure 103: Valeur moyenne du taux des ECS et nombre de FC.....	105
Figure 104: Valeur moyenne de l'IP et nombre d'EV.....	107
Figure 105: Valeur moyenne de la fréquence des MN et nombre d'EV	107
Figure 106: Valeur moyenne de l'IS et nombre d'EV.....	107
Figure 107: Valeur moyenne de l'IM et nombre d'EV	107
Figure 108: Valeur moyenne du taux des AC et nombre d'EV	108
Figure 109: Valeur moyenne de l'IR et nombre d'EV.....	108
Figure 110: Valeur moyenne du taux des ECS et nombre d'EV	108
Figure 111: Valeur moyenne de l'IP et GP en périnatale.....	110
Figure 112: Valeur moyenne de MN et Nbre GP en périnatale	110

Figure 113: Valeur moyenne de l'IS et Nbre de GP en périnatale.....	110
Figure 114: Valeur moyenne de l'IM et Nbre de GP en périnatale	110
Figure 115: Valeur moyenne du taux des AC et nombre de GP en périnatale	111
Figure 116: Valeur moyenne d l'IR et nombre de GP périnatale.....	111
Figure 117: Valeur moyenne des ECS et nombre de GP en périnatale	111
Figure 118: Représentation d'analyse en composante principale	114

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Valeur β -hCG au cours de la grossesse.....	25
Tableau2: Incidence des anomalies chromosomiques des couples souffrant d'ASPR	56
Tableau3: Répartition des anomalies chromosomiques en fonction du nombre d'AS	57
Tableau4: Répartition des anomalies chromosomiques selon le sexe du porteur	57
Tableau 5: Mode de vie des couples.....	74
Tableau 6: Retentissement psychologique et sociale	81
Tableau 11 7: Résultats du Test t Student de comparaison de moyenne de chaque paramètre à l'issue de grossesse	82
Tableau 8: étude du nombre de FCS en fonction des principaux paramètres.....	83
Tableau9: Aberrations chromosomiques et fausses couches.....	87
Tableau10: Comparaison des moyennes des différents biomarqueurs à celles des témoins	88
Tableau 11 : Résultats statistiques des indicateurs de génotoxicité en fonction du sexe.....	91
Tableau 12: Résultats statistiques des cinq biomarqueurs en fonction de l'âge maternel	94
Tableau 13: Résultats statistiques des biomarqueurs en fonction de l'âge paternel	97
Tableau 14: Résultats statistiques des biomarqueurs en fonction de la parité des couples	103
Tableau 150: Résultats statistiques des biomarqueurs en fonction du nombre de fausses couches.....	106
Tableau 16: Résultats statistiques des biomarqueurs en fonction du nombre des enfants vivants	109
Tableau 17: Résultats statistiques des biomarqueurs en fonction des grossesses perdues en périnatale	112
Tableau 18: Résultats des corrélations	113
Tableau 19: Statistiques descriptives.....	113
Tableau20: Vriance totale expliquée	114

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1 : Jumeaux malformé à 23 SA (diagnostiqué à l'échographie morphologique).....	26
Photographie 2 : Photographie 2: Foetus malformé macéré (17 SA).....	28
Photographie 3 : Produit de conception macéré évacué par curetage (foetus et placenta).....	32
Photographie 4 : Foetus malformé (Anencéphale).....	35

RÉSUMÉ

L'avortement spontané est un problème courant au cours de la grossesse, il affecte presque 25 à 50% des femmes qui tentent à procréer. Il a été évalué qu'entre 30% à 60% de toutes les grossesses dans l'espèce humaine échouent avant d'achever leur développement intra-utérin et que plus de 60% sont cytogénétiquement anormaux. La plupart des avortements ont lieu après la première semaine de gestation. Bien que la plupart des avortements sont sporadiques, 1 à 3% des couples présentent des avortements à répétition qui se définissent par deux avortements ou plus. Plusieurs pathologies ont été considérées comme causes des avortements, les anomalies chromosomiques représentent approximativement 50 à 60% des cas. Le mode de vie moderne, la sédentarité, et l'exposition aux toxines exogènes et endogènes conduisent à une augmentation des dommages de l'ADN. Ceci peut avoir un impact sur les ovocytes, les spermatozoïdes et/ou l'embryon en développement conduisant à l'infertilité, à des fausses couches et ou à des malformations congénitales. Dans le présent travail la génotoxicité et la cytotoxicité ont été évaluées in vitro sur des lymphocytes du sang périphérique humains de 30 couples colligés pour aux moins deux fausses couches, est-ce par l'étude des biomarqueurs cytogénétiques: la fréquence de Micronoyaux (MN), l'Indice de Prolifération cellulaire (IP), les Aberrations Chromosomiques (AC), l'Indice Mitotique (IM), l'Indice de Stimulation (IS), les Echanges entre les Chromatides Sœurs (ECS) et l'indice de Réplication (IR). Les résultats ont été comparés à ceux des témoins et ont affichés une instabilité chromosomique très marquée chez ces couples. La prévalence des aberrations chromosomiques est estimée à 53,34%, elles sont plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes ($R= 1,25$). Le taux des AC ($0,0066 \pm 0,0016$) ($p < 0,05$), La fréquence de MN ($0,0048 \pm 0,0003$) ($p < 0,001$), et le taux des ECS des couples ($1,8567 \pm 0,1742$) ($p < 0,001$) sont plus élevés en comparaison avec les témoins. Ainsi, ces tests peuvent constituer des biomarqueurs, prédictifs de la répétition des accidents abortifs ; ils peuvent constituer ainsi des facteurs pronostiques, concernant le résultat obstétrical. Les résultats de l'étude soulignent l'importance de l'exploration cytogénétique des couples aux antécédents de pertes fœtales spontanées à répétition, est ce, dès le second accident. À la lumière de ces données, un conseil génétique adapté est proposé. Les facteurs nutritionnels et environnementaux doivent également être pris en compte, ceci à toute son importance puisqu'il s'agit de facteurs modulables et permettant ainsi d'améliorer la prise en charge des couples souffrant de FCR, grâce à l'établissement de recommandations de régime alimentaire et de style de vie sans omettre le soutien psychologique.

Mots clés : avortements spontanés précoces à répétition, dommages de l'ADN, conseil génétique

ABSTRACT

Spontaneous abortion is a common problem during pregnancy, affecting almost 25 to 50% of women trying to conceive. Most abortions take place after the first week of gestation. It has been estimated that between 30% to 60% of all pregnancies in humans fail before they complete their intrauterine development and that more than 60% are cytogenetically abnormal. Although most abortions are sporadic, 1-3% of couples have recurrent abortions that are defined as two or more abortions. Several pathologies have been considered as causes of abortions, chromosomal abnormalities represent approximately 50-60% of cases. Modern lifestyle, sedentary lifestyle, and exposure to exogenous and endogenous toxins lead to increased DNA damage. This can impact on the oocytes, sperm and / or the developing embryo leading to infertility, miscarriages and / or birth defects. In the present work the genotoxicity and the cytotoxicity were evaluated in vitro on human lymphocytes of 30 couples collected for at least two miscarriages, by the studying biomarkers of cytogenetics: frequency of Micronuclei (MN), the Cellular Proliferation Index (PI), Chromosomal Aberrations (AC), Mitotic Index (MI), Stimulation Index (IS), Sister Chromatid Exchanges (ECS) and Replication Index (IR). The results were compared with those of the control and showed very marked genotoxicity in these couples. The prevalence of chromosomal aberrations in these couples is estimated at 53.34%, or 16 out of 30, more frequent in women than in men ($R = 1.25$). The rate of AC (0.0066 ± 0.0016) ($p < 0.001$), The frequency of MN (0.0048 ± 0.0003) ($p < 0.001$), and The rate of ECS was (1.8567 ± 0.1742) ($p < 0.001$) of the couples, were higher compared to the controls. Thus, these tests can constitute biomarkers, providers of the repetition of abortive accidents; they can thus constitute prognostic factors, concerning the obstetric result. Our results underline the importance of cytogenetic exploration of couples with a history of recurrent spontaneous fetal loss, even from the second accident. In the light of these results, suitable genetic counseling is offered. Nutritional and environmental factors must also be taken into account, this is of all importance since it is a modifiable factors and thus making it possible to improve the management of couples suffering from RM, thanks to the establishment of diet and lifestyle recommendations without omitting psychological support.

Keywords: repeated miscarriages, DNA damage, genetic counseling

ملخص

الإجهاض التلقائي مشكلة شائعة أثناء الحمل ، تؤثر على ما يقرب من 25 إلى 50% من النساء اللواتي يحاولن الحمل. تحدث معظم حالات الإجهاض بعد الأسبوع الأول من الحملوتشير التقديرات إلى أن ما بين 30% إلى 60% من جميع حالات الحمل عند البشر تفشل قبل أن يكملوا نموهم داخل الرحم كما أن أكثر من 60% من حالات الحمل هي جينيا غيرسليمة. على الرغم من أن معظم حالات الإجهاض تكون متقطعة ، فإن 1-3% من الأزواج لديهم عمليات إجهاض متكررة تُعرّف بإجهاضان أو أكثر. تم اعتبار العديد من الأمراض من أسباب الإجهاض ، وتمثل تشوهات الكروموسومات حوالي 50-60% من الحالات. يؤدي أسلوب الحياة الحديث و طريقة العيش المتسمة بالخمول و كذا التعرض للسموم الخارجية والداخلية إلى زيادة تلف الحمض النووي الشيء الذي من شأنه أن يؤثر سلبا على البويضات ، الحيوانات المنوية و / أو على الجنين النامي مما يؤدي إلى العقم، الإجهاض و / أو إال عيوب خلقية. في العمل الحالي ، تم تقييم السمية الجينية والسمية الخلوية في المختبر على الخلايا الليمفاوية البشرية لـ 30 زوجًا تم جمعها لإجهاضين على الأقل ، و ذلك من خلال دراسة المؤشرات الحيوية للوراثة الخلوية: تردد النوايا , مؤشر الثكاثر الخلوي , مؤشر الانقسام

الخلوي, الزيغ الصبغي, مؤشر التحفيز على الانقسام الخلوي والتبادلات الكروماتيدية الشقيقة. تمت مقارنة النتائج بنتائج المجموعة الشاهدة وأظهرت سمية جينية وسمية خلوية ملحوظة للغاية عند هؤلاء الأزواج. يُقدر انتشار الانحرافات الصبغية عندهم بـ 53.34% ، أو 16 من 30 ، وهي أكثر شيوعًا عند النساء منها عند الرجال (نسبة الأرجحية = 1.25). أما بالنسبة لمؤشر الزيغ الصبغي عند الأزواج قيد الدراسة، فهو أعلى مقارنة بالشهود (0.0016 ± 0.0066) كما هو الشأن لتردد النويات ($0,0003 \pm 0,0048$) و كذا التبادلات الكروماتيدية الشقيقة (0.1742 ± 1.8567). وعليه، يمكن لهذه المؤشرات أن تشكل عوامل تنبؤية لنتائج الولادة واحتمال تكرار الإجهاض. كما تؤكد نتائج الدراسة أهمية التحليل الخلوي الجيني للأزواج فاقدى الاجنة تلقائيا وبطريقة متكررة ابتداءا من الإجهاض الثاني.

وعلى ضوء هذه النتائج ، يتم تقديم الاستشارة الوراثية المناسبة مع مراعاة العوامل الغذائية والبيئية، وهذا أمر مهم لأنه عامل قابل للتعديل وبالتالي يجعل من الممكن تحسين التكفل بالأزواج الذين يعانون من هذا المشكل وذلك بفضل وضع توصيات النظام الغذائي ونمط الحياة دون إغفال الدعم النفسي.

الكلمات المفتاحية:

الإجهاض المتكرر ، تلف الحمض النووي ، الاستشارة
الوراثية

TABLES DES MATIERES

RÉSUMÉ.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
ملخص.....	XIV
INTRODUCTION GENERALE	1
OBJECTIFS DE LA THESE.....	3
1. OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	3
LA REPRODUCTION HUMAINE.....	4
1 INTRODUCTION.....	4
2 LA GAMETOGENESE FEMININE.....	4
2.1 L'APPAREIL DE REPRODUCTION FÉMININ	4
2.2 L'OVOGENÈSE	6
2.2.1 La phase de multiplication	6
2.2.2 La phase de maturation nucléaire	7
2.2.3 La phase de maturation cytoplasmique.....	8
2.3 LA FOLLICULOGENÈSE	8
2.3.1 Les follicules primordiaux.....	9
2.3.2 Les follicules primaires.....	9
2.3.3 Les follicules secondaires.....	9
2.3.4 Les follicules antraux.....	9
2.3.5 Les follicules de De Graaf	10
2.4 L'OVULATION	10
2.5 LE CYCLE OVARIEN.....	10
2.6 LE CYCLE MENSTRUEL.....	11
2.6.1 La phase de desquamation de j1 à j4 « les règles ».....	11
2.6.2 La phase de régénération de j5 à j8.....	11
2.6.3 La phase de prolifération de j9 à j14.....	12
2.6.4 La phase de transformation glandulaire de j15 à j21	12
2.6.5 La phase de sécrétion glandulaire de j22 à j28.....	12
3 LA GAMETOGENÈSE MASCULINE	12
3.1 L'APPAREIL DE REPRODUCTION MASCULIN	12
3.2 LA SPERMATOGENÈSE	14
3.2.1 La phase de multiplication	14
3.2.2 La phase de méiose.....	15
3.2.3 La phase de différenciation	16
3.2.4 La maturation des spermatozoïdes	17

3.3	LA REGULATION DE LA SPERMATOGENÈSE	18
3.3.1	La régulation hormonale	18
3.3.2	La régulation paracrine	19
4	LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRÉCOCE	19
4.1	LA FECONDATION	20
4.2	L'IMPLANTATION	20
4.3	LA PLACENTATION	22
4.4	LA GASTRULATION ET L'ORGANOGENÈSE	23
4.5	LA GROSSESSE NORMALE	23
4.6	CONFIRMATION DE LA GROSSESSE	24
4.6.1	Test de grossesse	24
4.6.2	Examen clinique	25
4.6.3	Ultrasonographie	25
4.7	ISSU DE LA GROSSESSE	26
4.7.1	Accouchement à terme	26
4.7.2	Echecs de la grossesse	26
	LES AVORTEMENTS SPONTANES PRECOCES	29
1	DEFINITION	29
2	CLASSIFICATION	29
3	ÉPIDEMIOLOGIE DES FAUSSES COUCHES	30
4	SYMPTOMES ET PRISE EN CHARGE DES FCS	31
5	ETIOLOGIES DES FAUSSES COUCHES	32
5.1	LA PATHOLOGIE UTÉRINE	32
5.2	LES ANOMALIES ENDOCRINIENNES	32
5.3	LES INFECTIONS	32
5.4	LES FACTEURS IMMUNOLOGIQUES	33
5.5	L'ÉTAT PROTHROMBIQUE	33
5.6	LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX	34
5.7	LES CAUSES GÉNÉTIQUES	35
5.7.1	Les anomalies chromosomiques	35
5.7.2	L'inactivation du chromosome X et ASR	36
5.7.3	Les microdélétions du chromosome Y	37
5.7.4	Les mutations génétiques et polymorphismes	38
5.7.5	Les anomalies de l'expression génique placentaire	39
5.8	LES MÉCANISMES ÉPIGÉNÉTIQUES	39
1	INTRODUCTION	41
2	LE CYCLE CELULAIRE	41
3	LES CAUSES DES DOMMAGES DE L'ADN	42

4	DOMMAGES DE L'ADN DANS LES CELLULES REPRODUCTRICES	43
5	REPARATION DE L'ADN	45
6	LES DOMMAGES DE L'ADN ET GROSSESSE	46
6.1	CORRELATION ENTRE LES PARENTS ET LEUR DESCENDANCE.....	46
6.2	L'INFERTILITE ET PERTE DE GROSSESSE PRECOCE.....	47
6.3	LES DOMMAGES DE L'ADN ET COMPLICATIONS TARDIVE DE LA GROSSESSE	48
7	MESURE DES DOMMAGES DE L'ADN.....	48
7.1	Caryotype.....	49
7.2	TEST DES MICRONOYAUX (MNX)	51
7.2.1	Formation des micronoyaux.....	51
7.2.2	Sort des cellules à micronoyaux	52
7.2.3	Fréquence de formation des micronoyaux	52
7.2.4	Micronoyaux et complications de la grossesse	53
7.3	TEST DES ECHANGES ENTRE LES CHROMATIDES SCEURS	53
7.4	TEST TERMINAL DE MARQUAGE DE DUTP-NICK END	54
7.5	TEST COMET	54
	ETUDE CYTOGENETIQUE ET AVORTEMENTS SPONTANES A REPETITION	55
1	INTRODUCTION	55
2	LES ANOMALIES GENETIQUES DES COUPLES ET AVORTEMENTS SPONTANES PRECOCS	55
2.1	L'INCIDENCE DES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES CHEZ LES COUPLES SOUFFRANT D'ASPR	55
2.2	LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DES COUPLES SOUFFRANT D'ASPR ET LE NOMBRE D'ASP	56
2.3	LES TRANSLOCATIONS CHROMOSOMIQUES DES COUPLES SOUFFRANT D'ASPR	58
2.4	LES REARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES COMPLEXES (CCR) ET ASP.....	61
2.5	LES ANOMALIES DU CHROMOSOME X ET LES AVORTEMENTS SPONTANES PRECOCS	61
	MATÉRIEL ET MÉTHODES	63
1	PATIENTS.....	63
2	DESCRIPTION DE L'ÉCHANTILLON	63
3	CULTURE CELLULAIRE	64
3.1	Milieu de culture	64
3.2	Mise en culture	64
3.2.1	Test des Micronoyaux	64
3.2.2	Test des aberrations chromosomiques et test des échanges entre les chromatides sœurs	65
3.3	Traitement cytologique	65
3.3.1	Choc hypotonique.....	65
3.3.2	Fixation des lymphocytes.....	65
3.3.3	Etalement des lymphocytes sur les lames	66
3.3.4	Coloration et analyse microscopique.....	66

4	BIOMARQUEURS UTILISES	66
4.1	TEST DES MICRONOYAUX	66
4.2	TESTS DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES ET DES ECHANGES ENTRE LES CHROMATIDES SCEURS.....	67
5	METHODES DE CALCUL.....	68
5.1	INDICE DE PROLIFERATION (IP).....	68
5.2	FRÉQUENCE DES MICRONOYAUX	68
5.3	INDICE MITOTIQUE.....	69
5.4	INDICE DE STIMULATION	69
5.5	ECHANGE ENTRE LES CHROMATIDES SCEURS ET INDICE DE REPLICATION	69
6	CAS TEMOINS	70
7	ANALYSE STATISTIQUE.....	70
8	VUE D'ENSEMBLE SUR LA METHODOLOGIE	70
	RESULTATS.....	71
	ANALYSE DESCRIPTIVE	72
1	INTRODUCTION.....	72
2	CARACTERISTIQUES SOCIODEMOGRAPHIQUES DE L'ECHANTILLON ETUDIE	72
2.1	ORIGINE GÉOGRAPHIQUE.....	72
2.2	REPARTITION DE L'ECHANTILLON SELON L'AGE	72
2.2.1	Âge maternel	72
2.2.2	Âge paternel	73
2.3	NIVEAU INTELLECTUEL, SOCIOECONOMIQUE ET COUVERTURE SANITAIRE	73
2.4	OCCUPATIONS DES COUPLES ETUDIES.....	73
3	NOTION DE CONSANGUINITE ET CAS SIMILAIRES DANS LA FAMILLE	73
4	MODE DE VIE DES COUPLES.....	74
5	ANTECEDENTS PATHOLOGIQUES	75
5.1	ANTECEDENTS MEDICAUX ET CHIRURGICAUX	75
5.2	ANTECEDENTS GYNECOLOGIQUES.....	75
5.3	ANTÉCÉDENTS OBSTÉTRICAUX	76
5.4	REPARTITION DES COUPLES EN FONCTION DU NOMBRE ET DE L'AGE GESTATIONNEL DES FCS..	78
5.5	ECHOGRAPHIE DU 1 ^{ER} TRIMESTRE ET FAUSSES COUCHES	78
5.6	ORDRE DES GROSSESSES ET FAUSSES COUCHES	79
5.7	PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES FAUSSES COUCHES	79
6	EVOLUTION DES FAUSSES COUCHES EN FONCTION DES PRINCIPAUX PARAMETRES.....	79
6.1	NOTION DE CONSANGUINITE	79
6.2	AGE A LA MENARCHE ET AGE PARENTAL	80
6.3	GESTITE ET PARITE	80

6.4	GROSSESSES PERDUES EN PERIODE PERINATALE ET ENFANTS VIVANTS.....	81
6.5	AGE GESTATIONNEL	81
7	RETENTISSEMENT PSYCHO-SOCIALE	81
	ETUDE ANALYTIQUE ET COMPARATIVE	82
1	INTRODUCTION.....	82
2	EVOLUTION DE L'ISSUE DES GROSSESSES ET DU NOMBRE DE FAUSSES COUCHES.....	82
3	ANALYSE DES DONNEES DES TESTS CYTOGENETIQUES.....	83
3.1	TEST DE MICRONOYAUX (MN) DES COUPLES.....	83
3.1.1	Indice de prolifération (IP)	83
3.1.2	Fréquence des Micronoyaux	83
3.2	TEST DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES (AC)	84
3.2.1	Indice de stimulation (IS).....	84
3.2.2	Indice Mitotique (IM).....	84
3.2.3	Taux des aberrations chromosomiques	85
3.3	TEST DES ECHANGES ENTRE LES CHROMATIDES SŒURS(ECS)	87
3.3.1	Taux des échanges entre les chromatides sœurs	87
3.3.2	Indice de Réplication (IR)	88
4	EVOLUTION DES INDICATEURS DE GENOTOXICITE EN FONCTION DES PRINCIPALES VARIABLES	88
4.1	EVOLUTION DES INDICATEURS DE GENOTOXICITE EN FONCTION DU SEXE	89
4.1.1	Indice de prolifération (IP)	89
4.1.2	Fréquence des micronoyaux	89
4.1.3	Indice de stimulation (IS) et Indice mitotique (IM).....	89
4.1.4	Taux des aberrations chromosomiques	90
4.1.5	Indice de Réplication.....	90
4.1.6	Taux des échanges entre les chromatides sœurs	90
4.2	EVOLUTION DES INDICATEURS DE GENOTOXICITE EN FONCTION DE L'AGE MATERNEL	91
4.2.1	Indice de prolifération (IP)	91
4.2.2	Fréquence des micronoyaux (MNX)	91
4.2.3	Indice de Stimulation (IS)	92
4.2.4	Indice Mitotique (IM).....	92
4.2.5	Taux des aberrations chromosomiques	92
4.2.6	Indice de Réplication.....	93
4.2.7	Echanges entre les chromatides sœurs	93
4.3	Evolution des indicateurs en fonction de l'âge paternel.....	94
4.3.1	Indice de prolifération.....	94
4.3.2	Fréquence des micronoyaux	94
4.3.3	Indice de Stimulation (IS)	95
4.3.4	Indice Mitotique	95
4.3.5	Taux des aberrations chromosomiques	96

4.3.6	Indice de Réplication.....	96
4.3.7	Echanges entre les chromatides soeurs.....	96
4.4	Evolution des indicateurs en fonction de la gestité des couples	97
4.4.1	Indice de Prolifération.....	97
4.4.2	Fréquence des Micronoyaux	97
4.4.3	Indice de Stimulation	98
4.4.4	Indice Mitotique	98
4.4.5	Taux des aberrations chromosomiques	98
4.4.6	Indice de Réplication.....	99
4.4.7	Echanges entre les chromatides sœurs.....	99
4.5	Etude des différents biomarqueurs en fonction de la parité des couples	100
4.5.1	Indice de Prolifération.....	100
4.5.2	Fréquence des Micronoyaux	100
4.5.3	Indice de Stimulation	101
4.5.4	Indice Mitotique	101
4.5.5	Taux des aberrations chromosomiques	101
4.5.6	Indice de Réplication.....	102
4.5.7	Echanges entre les chromatides sœurs	102
4.6	Evolution des biomarqueurs en fonction du nombre de fausses couches.....	103
4.6.1	Indice de Prolifération.....	103
4.6.2	Fréquence des Micronoyaux	103
4.6.3	Indice de Stimulation	104
4.6.4	Indice Mitotique	104
4.6.5	Taux des aberrations chromosomiques	104
4.6.6	Indice de Réplication.....	105
4.6.7	Echanges entre les chromatides soeurs.....	105
4.7	Evolution des biomarqueurs en fonction du nombre d'enfants vivants.....	106
4.7.1	Indice de Prolifération.....	106
4.7.2	Fréquence des Micronoyaux	106
4.7.3	Indice de Stimulation	107
4.7.4	Indice Mitotique	107
4.7.5	Taux des aberrations chromosomiques	107
4.7.6	Indice de Réplication.....	108
4.7.7	Echanges entre les chromatides sœurs	108
4.8	EVOLUTION DES BIOMARQUEURS DE GENOTOXICITE EN FONCTION DU NOMBRE DES GROSSESSES PERDUES EN PERIODE PERINATALE	109
4.8.1	Indice de Prolifération.....	109
4.8.2	Fréquence des Micronoyaux	109
4.8.3	Indice de Stimulation	110
4.8.4	Indice Mitotique	110

4.8.5	Taux des aberrations chromosomiques	110
4.8.6	Indice de Réplication.....	111
4.8.7	Echanges entre les chromatides sœurs	111
5	CORRELATION ENTRE LES DIFFERENTS PARAMETRES ETUDIES.....	112
5.1	CORRÉLATION DE RHO SPEARMAN.....	112
5.2	ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (ACP).....	113
	ANALYSE ET DISCUSSION DES RESULTATS	116
	PROFIL DES COUPLES SOUFFRANT D'AVORTEMENTS SPONTANES PRECOSES A REPETITION	117
	AVORTEMENTS SPONTANES PRECOSES A REPETITION ET ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES DES COUPLES.....	128
	AVORTEMENTS SPONTANES PRECOSES A REPETITION ET FREQUENCE DES MICRONOYAUX.....	133
	AVORTEMENTS SPONTANES PRECOSES A REPETITION ET ECHANGES ENTRE LES CHROMATIDES SŒURS	139
	PRISE EN CHARGE CYTOGENETIQUE DES COUPLESSOUFFRANT D'AVORTEMENTS SPONTANES PRECOSES A REPETITION	143
	SOUFFRANT SSOUFFRANT SOUFFRANT D'ASR.....	143
1	INTRODUCTION	143
2	ETUDE CYTOGENETIQUE DU PRODUIT DE CONCEPTION	143
3	CONSEIL GENETIQUE	144
4	DIAGNOSTIC PRENATAL (DPN).....	144
5	DIAGNOSTIC PRE-IMPLANTATOIRE (DPI).....	145
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	147
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	151
	ANNEXES	191

INTRODUCTION GENERALE

Il a été évalué qu'entre 30% à 60% de toutes les grossesses de l'espèce humaine échouent avant d'achever leur développement intra-utérin, on estime que plus de grossesses sont perdues spontanément que celles arrivant à terme et que plus de 60% sont cytogénétiquement anormaux [Rai et Regan, 2006; Stephenson et Kutteh, 2007]. L'avortement spontané (AS) est un problème courant au cours de la grossesse, il affecte presque 25 à 50% des femmes qui tentent à procréer, cependant seulement 15% des cas sont détectés cliniquement. Ainsi, la fréquence exacte des avortements spontanés reste inconnue, car ils se produisent souvent avant même que la femme reconnaisse sa grossesse.

La plupart des avortements ont lieu après la première semaine de gestation, et plus particulièrement jusqu'à la 14^{ème} semaine. Bien que la plupart des avortements sont sporadiques, 1 à 3% des couples présentent des avortements à répétition qui se définissent par deux avortements ou plus. Ceci est conçu comme un événement traumatisant, entraînant des symptômes de dépression, d'anxiété, et une baisse de l'estime de soi avec un retentissement significatif sur la vie psycho-sociale du couple [Bagchi et Friedman, 1999 ; Serrano et Lima 2006].

Plusieurs étiologies ont été considérées comme causes des avortements spontanés précoces, les anomalies chromosomiques représentent approximativement 50 à 60% des cas. La cause des avortements précoces à répétition peut être permanente et unique, comme elle peut être plus complexe correspondant à une association de facteurs favorisants.

Il est bien établi que les couples présentant des avortements spontanés précoces à répétition (ASPR) ont une incidence élevée d'instabilité chromosomique. Cette incidence dans la population générale est inférieure à 1% [Diejomaoh, 2015], alors qu'il varie entre 3 % à 6 % chez les couples ayant fait deux avortements spontanés ou plus [Brackeeleer et Dao, 1990 ; Clifford et al., 1994]. Lorsqu'un parent porte un réarrangement chromosomique, le risque d'avortement spontané est généralement de 25 à 50 % [Gardner et Sutherland, 1996]. Il est le résultat de la production de gamètes et d'embryons avec des dommages chromosomiques [Lindenbaum et Bobrow, 1975 ; Stene et Stengel-Rutkowski, 1982]. Les conséquences cliniques de ces gamètes anormaux incluent la stérilité, les avortements spontanés répétés et la naissance de nouveau-nés malformés [Chandley et al., 1975; Neri et al., 1983].

Il existe une littérature abondante concernant l'implication des anomalies chromosomiques dans la perte précoce des grossesses, mesurées à l'aide du test des aberrations chromosomiques. Cependant, il y a peu de données concernant l'implication de l'ADN endommagé évalué par le test des micronoyaux (Mnx), ainsi que le test des échanges entre les chromatides sœurs (ECS) dans les cas d'échec de la reproduction à un stade précoce.

L'analyse cytogénétique conventionnelle peut être réalisée sur les produits d'avortement, cependant elle est associée à des échecs de culture ou à des contaminations avec les cellules maternelles, en plus un certains nombres de grossesse sont perdues à un stade très précoce de développement et sont donc

difficile à examiner. Par conséquent, la plupart des travaux réalisés sur les AS à répétition sont basés sur l'étude des couples concernés.

La répétition des avortements est une maladie qui a été décrite comme un événement douloureux pour les couples. Ainsi, l'identification des facteurs sous-jacents est cruciale pour le développement d'un traitement plus efficace et l'amélioration des résultats des grossesses ultérieures chez les couples qui en souffrent. Devant cette expérience, le personnel soignant est responsable de fournir le soutien nécessaire aux familles endeuillées, d'explorer la cause de cette perte et d'en informer le couple. Ces informations peuvent donner une idée sur le pourquoi de la perte, qui pourra aider les parents dans leur processus de deuil et qui aura une grande valeur dans la détermination du risque de récurrence, le conseil et la prévention pour les grossesses futures.

C'est dans cette perspective, d'étudier les couples souffrants d'ASPR que s'inscrit la présente thèse. En prenant en compte l'énorme impact des anomalies chromosomiques des couples dans l'échec de la reproduction, ce travail a pour objectif principal l'évaluation des dommages chromosomiques sur le matériel génétique des lymphocytes du sang périphérique de ces couples. En effet, notre travail a été mené pour approfondir les connaissances concernant l'instabilité chromosomique chez les couples souffrant d'avortements spontanés précoces à répétition. Il tentera de relier le niveau des dommages chromosomiques dans les lymphocytes du sang périphérique des couples atteints, par le biais du test des aberrations chromosomiques, le test des micronoyaux, et le test des échanges entre les chromatides sœurs (ECS).

Soixante patients (trente couples) ayant eu au moins deux avortements spontanés précoces dans leurs antécédents ont fait l'objet de cette étude. La thèse relate les résultats de cette dernière ayant permis de développer une réflexion sur les dommages de l'ADN mesurés par le dosage des biomarqueurs de génotoxicité (IP, MN, IS, IM, AC, ECS et IR) et les ASPR, tout en prenant en considération les données collectées à l'aide d'une fiche d'exploitation. Des propositions d'amélioration de la prise en charge de ces couples, ainsi que des recommandations pratiques seront suggérées.

OBJECTIFS DE LA THESE

1. OBJECTIFS DE L'ETUDE

La présente thèse a pour trait l'étude cytogénétique des couples souffrant d'avortements spontanés précoces à répétition. Aucune étude du genre n'a été réalisée, dans notre contexte marocain. Le choix de notre sujet émane de son intérêt capital visant à répondre aux attentes d'une population en détresse par l'exploration d'une piste qui n'a jamais été explorée auparavant chez nous au Maroc et peu explorée via le monde entier. L'instabilité chromosomique peut être une des causes majeures des d'avortements spontanés précoces à répétition, tout en sachant que dans 50% des cas la cause reste inconnue. Ce sujet nous a semblé être intéressant pour une recherche dans le cadre d'une thèse pour plusieurs raisons :

- (i) Il s'agit d'une pathologie mal connue, les avortements spontanés récurrents, et dont la prise en charge reste très difficile ;
- (ii) L'impact non négligeable des pertes fœtales sur le vécu des couples, la répétition des échecs reproductifs est éprouvante et s'apparente parfois à un vécu de stérilité ;
- (iii) La nécessité d'apporter des réponses aux questionnements légitimes des patientes et de leurs conjoints (qui manquent dans plusieurs cas) ;
- (iv) L'intérêt capital de l'exploration cytogénétique dans la prise en charge des couples atteints.

La thèse vise plus particulièrement les objectifs suivants :

- Déterminer le profil sociodémographique des couples souffrant d'ASP à répétition ;
- Préciser leur mode de vie, leurs antécédents pathologiques ;
- Etudier l'histoire gynéco-obstétricale des femmes sujettes de l'étude ;
- Cerner le retentissement psycho-sociale de cette maladie sur les couples étudiés ;
- Evaluer le degré de génotoxicité dans les lymphocytes du sang périphérique des couples souffrant d'avortements spontanés précoces à répétition ;
- Obtenir une prise de conscience quant à la place des dommages chromosomiques dans la génèse de cette pathologie ;
- Emettre des propositions pratiques et dégager des recommandations susceptibles de contribuer à l'amélioration de la prise en charge de ces couples.

LA REPRODUCTION HUMAINE

1 INTRODUCTION

La reproduction humaine est un processus qui semble remarquablement inefficace. Au cours de chaque cycle, environ 80 follicules ovariens sont déclenchés pour démarrer le processus de maturation; habituellement, un seul termine ce processus et aboutit à une ovulation. Ceci est suivi par une probabilité moyenne de concevoir d'environ 20% par cycle [Zinaman et col, 1996]. Seulement environ 30 à 50% de toutes les conceptions entraînent une naissance vivante, la plupart seront avortées avant même la prochaine menstruation [Macklon et al, 2002 ; Wilcox AJ et al, 1988].

Néanmoins, ce processus inefficace produit de très bons résultats car la grande majorité des grossesses qui échappe au processus de sélection naturelle via les fausses couches se traduira par la naissance d'un nouveau né en bonne santé, qui finira par transmettre ses gènes à la génération suivante. Pour ce faire, ce processus à la fois complexe et long nécessite :

- Une bonne intégrité de l'appareil de reproduction féminin et masculin ;
- Un bon déroulement de la gamétogenèse féminine et masculine ;
- Un patrimoine génétique à transmettre sans aucune anomalie ;
- Un cycle menstruel régulier et un endomètre réceptif bien préparé et adéquat pour le bon déroulement de ce processus ;
- Une bonne commande de l'axe hypothalamo-hypophysaire ;
- Une bonne hygiène de vie au sein d'un environnement sain ;
- Et un bon suivi médical en pré-conceptionnel et au cours de la grossesse.

2 LA GAMETOGENESE FEMININE

2.1 L'APPAREIL DE REPRODUCTION FÉMININ

Le système génital féminin (Figure 1) se compose des organes génitaux internes (y compris les ovaires, les trompes utérines, l'utérus, et le vagin) et les organes génitaux externes (le périnée et la vulve). Ce système est situé profondément dans la cavité pelvienne et se compose essentiellement de deux parties: un corps glandulaire ; l'ovaire ; où les ovocytes sont formés et les hormones stéroïdes synthétisées, et un système de conduits étendu, qui prend successivement les noms des trompes utérines (fallope), de l'utérus et du vagin. Ces tubes ont un double objectif de fournir un canal pour que le sperme éjaculé puisse remonter vers l'ampoule tubaire et pour amener un ovule fécondé ou non fécondé jusqu'à l'utérus et ou bien l'expulsé en dehors des voies génitales, ainsi qu'une voie d'évacuation des menstruations.

La trompe utérine est un conduit musculo-membraneux pair constituant la voie de passage des gamètes et leur chambre de fécondation. Elle recueille l'ovocyte sur la surface ovarienne et conduit le zygote à l'utérus. Le canal tubaire fait communiquer les cavités ; utérine et péritonéale. La trompe mesure environ 11 cm de long, une trompe de moins de 3 cm est un facteur péjoratif pour une conception physiologique. Sa structure

aide au cheminement des spermatozoïdes. Ces derniers se déplacent à travers les trompes utérines pour atteindre la partie ampullaire où ils rencontrent l'ovocyte (fécondation).

Les plis de ses parois lui donnent un aspect labyrinthisque, leur structure permet d'acheminer l'ovocyte fécondé (l'œuf ou zygote) vers la cavité utérine où il s'implantera pour commencer son développement.

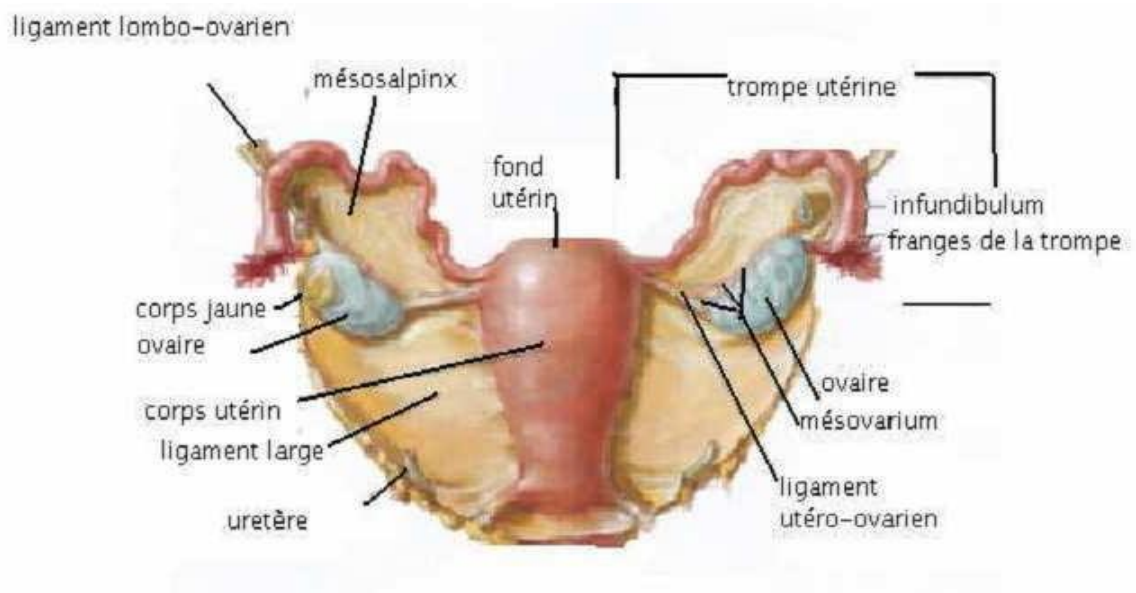


Figure 1: Appareil de reproduction féminin[Netter et al., 2006]

L'utérus est responsable de l'accueil de l'œuf fécondé pendant son développement et, une fois qu'il est à terme, le fœtus est expulsé en dehors des voies génitales au cours de l'accouchement. Le vagin sert de voie de passage du fœtus et du placenta pendant le travail, mais également un organe de copulation.

La partie inférieure du vagin se termine dans la vulve, qui est formée par un ensemble des organes de nature variable le reliant à l'extérieur du corps : le vestibule, les petites lèvres, les grandes lèvres, et le clitoris.

Un système annexiel est attaché à l'ovaire, aux canaux et à la vulve: ce système se compose de diverses glandes développées autour de l'extrémité inférieure du vagin et l'urèthre, ainsi que les muscles, les membranes et les fascias comprenant le périnée.

Les ovaires ou gonades féminines sont 2 glandes paires, et symétriques situés de chaque côté de l'utérus. Ils constituent les principaux organes de la reproduction féminine, c'est le site de la gamétogenèse féminine « l'ovogenèse ». Il est constitué essentiellement de follicules qui contiennent une seule cellule germinale, l'ovocyte, entouré par des cellules somatiques de soutien, les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque (Figure 2).

Les ovaires fonctionnent, également, comme des organes endocriniens en sécrétant les hormones féminines : les œstrogènes et la progestérone. Ils se présentent sous la forme d'une paire de glandes, ayant la forme d'une amande, de 4 cm de long sur 2 cm de large et 1 cm d'épaisseur, son poids est de 6 à 8 grammes pendant la période d'activité génitale de la femme et de 1 à 2 grammes après la ménopause.

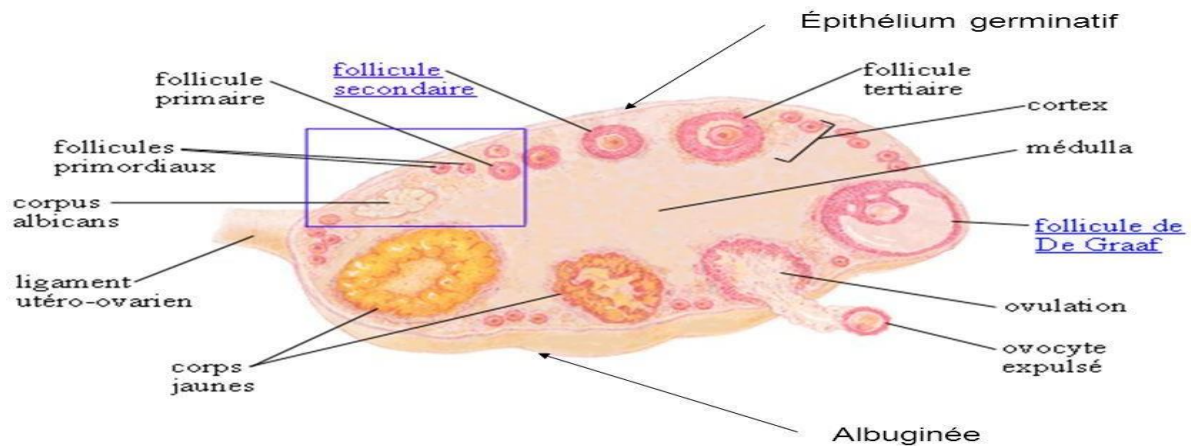


Figure 2: Schéma de l'ovaire représentant le follicule et l'ovocyte en développement dans le cortex ovarien [Benjamin, 2001].

L'ovaire comprend plusieurs couches et types de tissus, illustrés à la Figure 2. La couche la plus interne est la médulla, qui abrite les vaisseaux sanguins essentiels à la vascularisation de l'ovaire. À l'extérieur de celui-ci se trouve le cortex ovarien, qui est constitué de follicules et de tissu stromal. La couche la plus externe de l'ovaire est constituée d'une fine couche de cellules épithéliales. Connue comme l'épithélium germinatif, cette couche produit des milliers de follicules primordiaux pendant la croissance fœtale.

Sous-jacent à l'épithélium germinatif, une solide couche de tissu conjonctif connue comme la tunique albuginée (TA). La production d'ovule et la maturation d'ovocyte se produisent dans le cortex de l'ovaire. Au fur et à mesure que les follicules primordiaux sont recrutés et se développent, ils se rapprochent du bord externe de l'ovaire, finissant par éclater à la surface pendant l'ovulation.

2.2 L'OVOGENÈSE

L'ovogenèse ou formation des ovocytes, est la gamétogenèse chez la femme. Elle se déroule au sein des follicules situés dans l'ovaire et débute lors de la vie embryonnaire. C'est un processus discontinu par lequel une cellule germinale femelle se développe et se différencie en un ovocyte fécondable. Il s'étend de la vie fœtale jusqu'à la ménopause et comporte trois phases : la phase de multiplication, la phase de maturation nucléaire (incomplète) et la phase de maturation cytoplasmique.

2.2.1 La phase de multiplication

L'ovogenèse débute environ 3 semaines après la fécondation. Les cellules germinales primordiales (CGP) proviennent du sac vitellin et migrent via des mouvements amiboïdes, à travers l'intestin postérieur, jusqu'à la crête génitale [Fujimoto et al., 1977; Witchi, 1948]. Au cours de cette migration les CGP subissent une division mitotique rapide. À leur arrivée, les CGP donnent lieu à des ovogonies ou cellules souches germinales (CSG) qui continuent à proliférer pour élargir encore le pool des cellules germinales (Figure 3). Le nombre d'ovogonies passe de 600 000 à la huitième semaine de gestation à plus de 10 fois ce nombre en

20 semaines. Vers la 7^{ème} semaine de gestation, ces cellules forment les cordons médullaires primitifs et les cordons sexuels, respectivement.

La formation des follicules commence vers les semaines 16 et 18 de la vie fœtale. Les ovogonies sont enveloppées des cellules épithéliales somatiques dérivées de cellules mésenchymateuses de la crête génitale, formant des follicules primordiaux. Les ovogonies cessent alors l'activité mitotique et entrent en méiose [Gondos et al., 1986; Byskov, 1986; Goto et al., 1999].

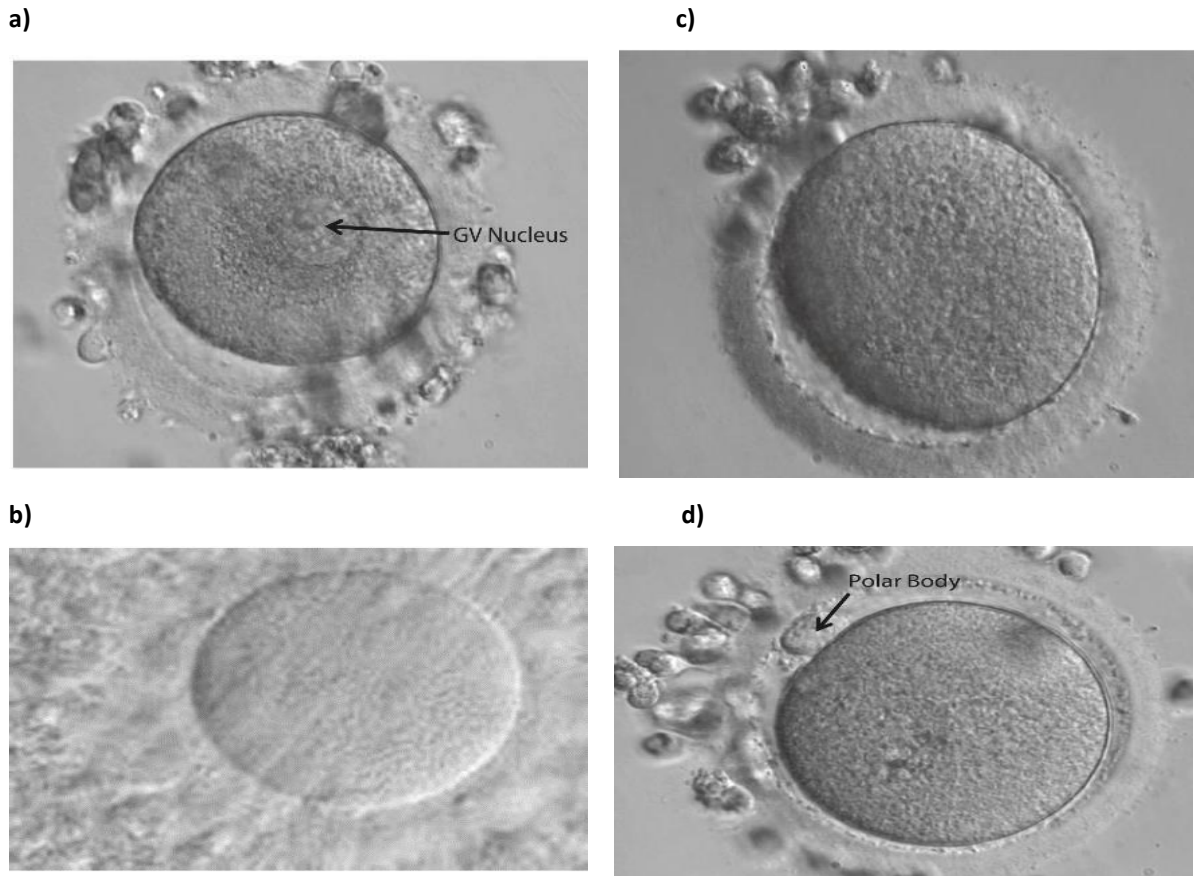


Figure 3: Les différents stages de maturation ovocytaire

a) Ovocyte en prophase 1 de la méiose 1 ; b) Ovocyte en métaphase 1 ; c) Complexe cumulus: ovocyte présentant une morphologie généralement associée aux ovocytes matures au moment de l'ovulation ; d) Ovocyte mature en métaphase II [Falcone and Hurd, 2013].

2.2.2 La phase de maturation nucléaire

Une fois la méiose est initiée, la cellule germinale est appelé ovocyte primaire. Le mésenchyme environnant les cellules somatiques secrète la membrane basale du follicule et donne naissance à la couche des cellules de la granulosa. A 4-5 mois de gestation, l'ovaire a son nombre maximum d'ovocytes, entre 5 et 8 millions. Ce nombre diminue considérablement à 1-2 millions à la naissance et moins de 500 000 à la puberté [Baker, 1963]. Les follicules primordiaux contenant ces ovocytes immatures restent essentiellement quiescents. Au cours des 35 à 40 prochaines années de la vie reproductive d'une femme, un petit nombre de follicules sont régulièrement libérés dans le pool de croissance [Hardy et al., 2000 ; Hansen et al., 2008].

Les ovocytes primaires diploïdes subissent deux divisions méiotiques : une division réductionnelle qui aboutit à la formation des ovocytes secondaires haploïdes, et une division équationnelle qui fournit des ovocytes haploïdes [Falcone and Hurd, 2013; Conti and Chang, 2016; Desai et al., 2017]. La méiose ovocytaire est discontinue.

En effet, l'ovocyte primaire entame sa première division pendant la vie fœtale, mais il subit un premier blocage au stade diplotène de la prophase I sous l'action de l'inhibiteur de la méiose ovocytaire (IMO), produit par les cellules de la granulosa, avec un noyau typique appelé noyau dictyé. Ce blocage persiste une très longue période, puisque cette première division ne reprendra qu'au moment de l'ovulation, où il subit un deuxième blocage en métaphase II jusqu'à la fécondation [Falcone and Hurd, 2013; Conti and Chang, 2016; Desai et al., 2017]. La méiose de l'ovogenèse est caractérisée par une inégalité des divisions. En effet, si la répartition chromosomique lors de la division de l'ovocyte primaire est équitable, celle du cytoplasme ne l'est pas, dans le sens où la quasi totalité du cytoplasme est conservée par l'une des cellules filles, appelée désormais l'ovocyte secondaire.

Alors que l'autre cellule fille est appelée 1^{er} globule polaire, l'ovocyte secondaire va subir une deuxième division comparable à la première qui va fournir un 2^{ème} globule polaire. A la fin de cette phase, contrairement à la spermatogenèse, un ovocyte primaire ne fournit qu'un seul gamète, l'ovocyte secondaire [Falcone and Hurd, 2013; Conti and Chang, 2016; Desai et al., 2017].

2.2.3 La phase de maturation cytoplasmique

Cette phase comporte trois étapes : une étape de transcription d'ARN qui a lieu au cours de la prophase de la première division bloquée au stade diplotène, où le diamètre de l'ovocyte passe de 14 à 100 micromètres. Une étape de traduction de ces ARNs qui a lieu dans l'ovocyte primaire. En effet, la synthèse d'un certains nombres de protéines rend l'ovocyte compétent pour reprendre la méiose lors de l'ovulation et lors de la fécondation. L'ovocyte ne subit pas de modifications morphologiques spectaculaires durant cette étape et reste sphérique, c'est une étape de mise en réserve des ARNs. En effet, la plupart des ARNs transcrits lors de la première étape sont stockés pour être traduit après la fécondation et durant les stades du développement embryonnaire.

2.3 LA FOLLICULOGENÈSE

La folliculogenèse est l'ensemble des mécanismes qui assurent la croissance et la maturation des follicules [Sadeu and Nogueira, 2011; Hugues, 2016]. Chez la femme, la folliculogenèse est un processus long qui dure plusieurs mois et qui est cyclique, puisque les follicules sont recrutés d'une manière régulière depuis le stade de follicule primordial à l'ovulation.

Contrairement à l'ovogenèse, la folliculogenèse est un processus continu de la puberté à la ménopause et elle est très sélective. Il ne concerne que moins de 0,1% des follicules primordiaux tandis que les autres follicules subissent un phénomène d'atrésie [Zeleznik, 2004].

Les follicules ovariens sont les unités fonctionnelles du système reproductif féminin. Chaque follicule contient un ovocyte entouré par des cellules somatiques de soutien. Ils sont classés selon leurs tailles et

leurs morphologies en follicules primordiaux, follicules primaires, follicules secondaires, follicules antraux et follicules de De Graaf (Figure 4) [Hugues, 2016].

2.3.1 Les follicules primordiaux

Les follicules primordiaux ont un diamètre de 40 à 50µm. Ils sont formés par l'association de l'ovocyte primaire, bloqué au stade diplotène de la prophase I, à une seule couche des cellules folliculeuses aplaties, dites endothéliformes ou cellules de la pré-granulosa, séparée du stroma ovarien par une membrane basale épaisse appelée la membrane de Slavjanski [Hugues, 2016].

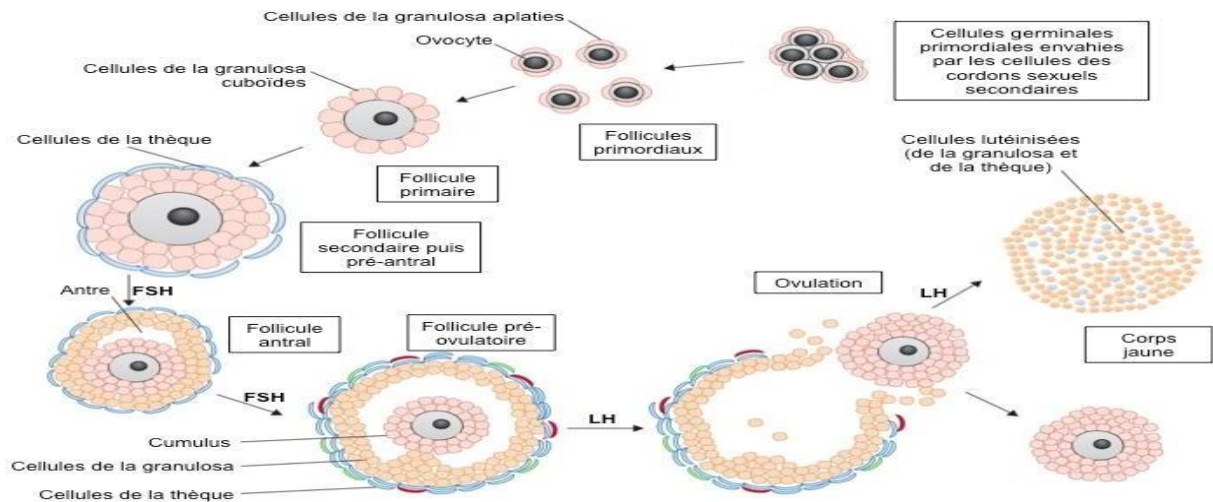


Figure 4: La folliculogénèse dans l'ovaire humain [Georges et al., 2014]

2.3.2 Les follicules primaires

Le follicule primaire diffère du follicule primordial par l'aspect des cellules folliculeuses qui sont devenues cubiques et par sa taille deux fois plus grande. Ils ont un diamètre qui passe de 60 à 80µm. Le diamètre de la vésicule germinative atteint environ 20 µm [Hugues, 2016].

2.3.3 Les follicules secondaires

Le follicule secondaire se caractérise par la formation d'une 2ème assise cellulaire, puis par une augmentation continue du nombre des cellules folliculeuses constituant la granulosa ; parallèlement, l'ovocyte I augmente de volume (de 40 micromètres dans le follicule primaire, il passe progressivement à une taille de 60 micromètres) et s'entoure d'une enveloppe glycoprotéique, la zone pellucide [Maresh et al., 1990]. Ils ont un diamètre qui varie entre 200 et 400µm. Les cellules de la granulosa entrent en contact avec l'ovocyte via des jonctions communicantes qui vont assurer un échange métabolique. Les cellules du stroma interne se différencient pour former la thèque interne avec des récepteurs de LH [Young and McNeilly, 2010].

2.3.4 Les follicules antraux

Les follicules antraux ont un diamètre de 1 à 20mm, ils se caractérisent par l'apparition de la cavité folliculaire ou antrum. Les cellules de la granulosa entourant l'ovocyte constituent le cumulus oophorus ou disque proligère. L'ovocyte a grossi et son noyau a la taille d'un follicule, le tissu conjonctif présent autour

du follicule s'est différencié en une thèque interne bien vascularisée avec de grandes cellules riches en lipides qui produiront des hormones et une thèque externe contenant de gros vaisseaux. L'activité de prolifération des cellules de la granulosa atteint un maximum à la fin de la maturation du follicule antral [Fortune, 2003].

2.3.5 Les follicules de De Graaf

Le follicule de de Graaf, ou follicule préovulatoire, ou follicule mûr, a atteint son volume maximal (2 cm) ainsi que l'ovocyte I (120 micromètres) et qui est toujours bloqué en prophase de la première division méiotique ; il fait saillie à la surface de l'ovaire qu'il déforme et amincit au niveau d'une petite plage translucide, le stigma sous l'action d'une décharge plasmatique des gonadotrophines hypophysaires, la FSH et la LH. Il forme avec les cellules de la granulosa, qui l'entoure directement, le cumulus oophorus. La première couche des cellules de la granulosa qui entoure l'ovocyte porte le nom de corona radiata. La membrane de Slavjanski sépare toujours la thèque interne des cellules de la granulosa, et le tout est limité par la thèque externe [Hugues, 2016].

2.4 L'OVULATION

Au quatorzième jour du cycle menstruel, en moyenne, le follicule éclate ; il libère l'ovocyte mûri, devenu ovule, qui quitte l'ovaire pour atteindre la trompe correspondante. Elle consiste à la rupture de la paroi du follicule et de l'ovaire. Au niveau du follicule, Le cumulus se détache de la granulosa et subit une mucification, ce qui conduit à une augmentation du volume. L'ovocyte se détache de la corona radiata et les prolongements des cellules péri-ovocytaires se rétractent hors de la zone pellucide. L'ovocyte bloqué en prophase I, doit terminer la première division méiotique. Cette reprise de la méiose se fait en réponse au pic pré-ovulatoire du LH [Mehlmann, 2005].

2.5 LE CYCLE OVARIEN

Le cycle ovarien peut être divisé en trois phases distinctes : **la phase folliculaire, l'ovulation et la phase lutéale.**

- **La phase folliculaire** : s'étend du premier jour des règles jusqu'à l'ovulation [Fauser and Van Heusden, 1997]. Durant cette période, les follicules primordiaux subissent quatre phénomènes : le recrutement, la croissance basale, la sélection et la dominance. D'abord, les follicules primordiaux quiescents subissent un phénomène de recrutement pour reprendre leur développement et évoluer, durant la phase de croissance basale, en un follicule secondaire. Ensuite, une sélection d'une dizaine de follicules secondaires est réalisée. Ces derniers vont augmenter de taille sous l'influence de la FSH, et sécréter, sous l'effet de la LH, des androgènes par les cellules de la thèque. Les androgènes vont diffuser dans les cellules de la granulosa où ils seront convertis, sous l'action de l'aromatase, en œstrogènes. Le taux des œstrogènes augmente dès le 5^{ème} jour du cycle ce qui entraîne une diminution de la sécrétion de la FSH par l'hypophyse par un mécanisme de rétrocontrôle négatif [Fauser and Van Heusden, 1997]. La diminution du taux de FSH dans le sang est responsable de l'atrésie de la plupart des follicules. Le follicule

le plus sensible à la FSH va poursuivre sa croissance et évoluer en un follicule de De Graaf, c'est la dominance.

- **L'ovulation** : se caractérise par l'expulsion de l'ovocyte mature par l'ovaire. Elle dure environ 48 heures. Lorsque le taux d'œstrogène atteint un seuil de 300 à 350 pg/ml, il déclenche la sécrétion de la LH par l'hypophyse, ce qui entraîne l'ovulation après en moyenne 36 à 48h.
- **La phase lutéale** : s'étend de l'ovulation à l'arrivée des règles. Elle dure en général environ 14 jours. Après l'expulsion du complexe cumulo-ovocytaire hors du follicule de De Graaf, celui-ci va se transformer en corps jaune et sécréter principalement la progestérone et un peu d'œstrogènes. La sécrétion de la progestérone atteindra un pic maximal aux alentours du 9^{ème} jour post-ovulatoire. La paroi de l'endomètre, sous l'action de la progestérone, s'épaissit et se vascularise c'est la phase sécrétoire. En absence de la fécondation et de la nidation, le corps jaune va régresser et se transformer en corps blanc. L'endomètre sera éliminé en fin de cycle, ce sont les menstruations.

2.6 LE CYCLE MENSTRUEL

C'est l'ensemble des phénomènes physiologiques de la femme préparant son organisme à une éventuelle fécondation. La durée habituelle du cycle menstruel est de 28 jours, mais il peut être plus long ou plus bref, il n'est pas toujours régulier. Il commence à la puberté et se termine à la ménopause. Théoriquement, le cycle menstruel est simplement la période des pertes sanguines, mais la description du cycle menstruel comprend aussi le cycle ovarien, passage du follicule primaire à l'ovulation et au corps jaune qui délivre la progestérone. Durant le cycle menstruel, la muqueuse utérine s'épaissit en vue d'accueillir un embryon. Dans le même temps ou se produit le cycle ovarien, pendant lequel une cellule sexuelle féminine, ou ovocyte, mûrit en vue d'une fécondation.

Par convention, le premier jour du cycle correspond au premier jour des règles. La croissance de l'endomètre recommence dès le 5^{ème} jour et se poursuit pendant tout le cycle : de 0,5 mm à la fin de la menstruation, il passe à 3 mm au moment de l'ovulation pour atteindre 5 mm au 28^{ème} jour du cycle. On différencie :

2.6.1 La phase de desquamation de j1 à j4 « les règles »

Celle-ci dure entre deux et huit jours, en moyenne cinq jours. Elles sont dues à une chute du taux d'hormones secrétées par les ovaires, qui déclenche le détachement de la muqueuse utérine interne et l'écoulement sanguin. Il se produit une chute des taux plasmatiques d'œstrogènes et de progestérone due à la dégénérescence du corps jaune qui provoque un affaissement de la zone fonctionnelle de l'endomètre avec une ischémie (due aux contractions rythmiques des artérioles), entraînant une nécrose des glandes, du chorion et des vaisseaux responsable de la menstruation. Il ne reste plus que la zone résiduelle, épaisse de 0,5 mm qui persiste avec quelques culs-de-sac glandulaires ouverts dans la cavité utérine et des petits vaisseaux.

2.6.2 La phase de régénération de j5 à j8

La sécrétion de 17-beta-estradiol stimule la croissance de l'endomètre à partir des culs-de-sac glandulaires ; l'épithélium de surface se reforme, les glandes s'allongent un peu, ainsi que les artérioles ; les mitoses sont nombreuses dans l'épithélium de surface, les glandes et le chorion.

2.6.3 La phase de prolifération de j9 à j14

La muqueuse continue sa croissance ; les glandes et les artères s'allongent plus vite que le chorion, ce qui entraîne une légère sinuosité des glandes et un début de spiralisation des artères en profondeur ; les cellules épithéliales augmentent de hauteur et ont un pôle apical clair.

2.6.4 La phase de transformation glandulaire de j15 à j21

Phase de sécrétion débutante sous l'action combinée des œstrogènes et de la progestérone, les glandes deviennent plus longues et plus sinueuses, la spiralisation des artérioles s'accroît ; la progestérone provoque la sécrétion de glycogène au pôle basal des cellules, les noyaux sont donc en position médiane, voire apicale.

2.6.5 La phase de sécrétion glandulaire de j22 à j28

Les glandes deviennent très contournées, la lumière glandulaire étant déformée par des pointes ou épines conjonctives du chorion ; le glycogène gagne le pôle apical et est excrété hors de la cellule : c'est la phase de sécrétion-excrétion ; les artérioles atteignent leur spiralisation maximale ; l'aspect des glandes et des artères vient du fait qu'elles se développent beaucoup plus vite que le chorion, les artérioles ont une longueur 10 fois supérieure à l'épaisseur du chorion. Ce cycle est contrôlé par des hormones. Schématiquement on note deux phases : la phase folliculaire, qui correspond à la croissance d'un ovocyte jusqu'à l'ovulation, et la phase lutéale, qui se situe après l'ovulation.

3 LA GAMETOGENÈSE MASCULINE

3.1 L'APPAREIL DE REPRODUCTION MASCULIN

L'appareil génital masculin est l'appareil de reproduction de l'homme, il est étroitement lié à l'appareil urinaire. Il se compose des cordons spermatiques, du scrotum, des testicules, des épидидymes, des canaux déférents, des canaux éjaculateurs, des vésicules séminales, de la prostate, de l'urètre et du pénis (Figure 5).

Les testicules sont de forme ellipsoïde, mesurant 2,5 × 4 cm de diamètre et englobés par une capsule (tunica albuginea) de tissu conjonctif solide [Middendorff R et al., 2002]. Le long de son bord postérieur, le testicule est vaguement relié à l'épididyme, ce qui donne remontée vers le canal déférent à son pôle inférieur [de Kretser et al., 1989]. Le testicule a deux fonctions principales : il produit des hormones, notamment la testostérone, et il produit les gamètes mâles, les spermatozoïdes. Les spermatozoïdes expriment des antigènes uniques qui ne sont pas formés jusqu'à la puberté.

Le testicule a deux fonctions principales : il produit des hormones, notamment la testostérone, et il produit les gamètes mâles ; les spermatozoïdes. Ces derniers expriment des antigènes uniques qui ne sont pas formés jusqu'à la puberté. La barrière hémato-testiculaire se développe au fur et à mesure que ces auto-

antigènes se développent, elle fait du testicule, un site immunologiquement privilégié. Le testicule est incomplètement divisé en une série de lobules.

La plupart du volume du testicule est constitué des tubes séminifères, qui sont bouclés et confinés dans des cloisons fibreuses. Ces cloisons divisent le parenchyme en environ 370 lobules coniques constitués des tubules séminifères et le tissu intertubulaire. Les tubules séminifères sont séparés par des groupes de cellules de Leydig, vaisseaux sanguins, lymphatiques, et les nerfs. Les tubules séminifères sont le siège de la production des spermatozoïdes. Chaque tubule séminifère est d'environ 180 µm de diamètre, la hauteur de l'épithélium germinal mesure 80 µm, et l'épaisseur du tissu pérítubulaire est d'environ 8 µm (Figure 6).

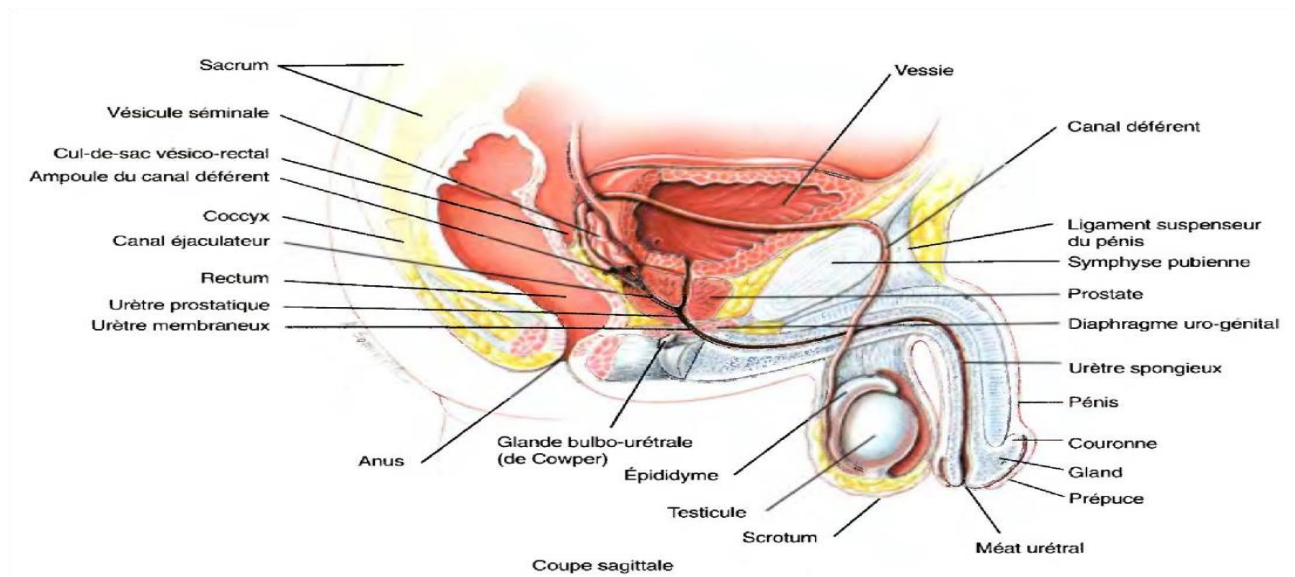


Figure 5: Coupe sagittale de l'appareil génital masculin [Tortora and Grabowski, 1994]

L'épithélium germinal se compose de cellules à différents stades de développement situés dans les invaginations des cellules de Sertoli, à savoir les spermatogonies, les spermatocytes primaires et secondaires, et les spermatides. Les deux extrémités des tubules séminifères sont ouvertes dans les espaces du rete testis. Le liquide sécrété par les tubules séminifères sont collectés dans le rete testis et livrés dans le système canalaire de l'épididyme.

Les cellules de soutien des testicules désignent les cellules qui font partie du développement cellulaire qui conduit à un sperme mature. Ils sont cependant extrêmement importants pour la production de sperme, et la spermatogenèse serait impossible sans elles. Les deux cellules les plus importantes sont les cellules de Leydig et de Sertoli qui représentent la principale source de testostérone, l'hormone sexuelle masculine. L'hormone pituitaire, l'hormone lutéinisante (LH), agit sur les cellules de Leydig pour stimuler la production de la testostérone. Les cellules de Sertoli se multiplient et se différencient durant la vie intra-utérine et durant les premiers mois après la naissance sous l'effet d'une élévation fugace des hormones gonadotropes FSH (follicle-stimulating hormone) et LH (luteinizing hormone) [Sharpe et al., 2003].

Les périodes prénatales et périnatales sont cruciales pour le bon déroulement de la spermatogenèse qui dépend, à partir de la puberté du nombre et de la qualité des cellules de Sertoli [Orth et al., 1988; Johnson et al., 1984]. Ces cellules jouent un rôle structural très important, les cellules de Sertoli sécrètent plusieurs

protéines importantes pour le soutien et la maturation des cellules germinales dont l'inhibine, l'androgen binding protein (ABP) et l'hormone anti- mullérienne (AMH) [Sofikitis et al., 2008].

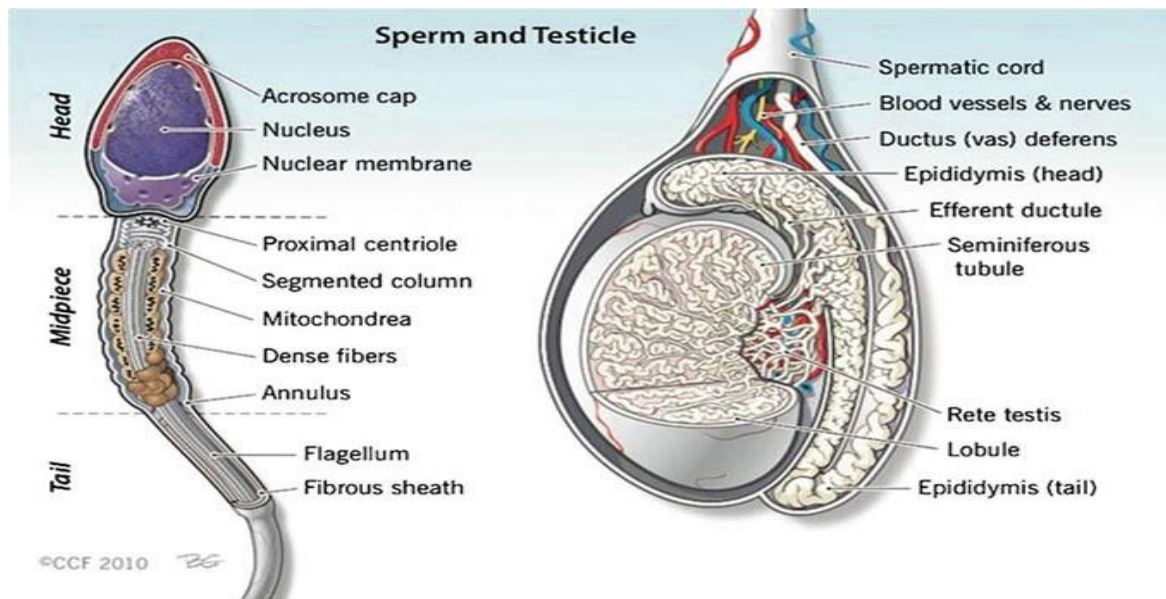


Figure 6: Le testicule humain et son épидидyme avec à gauche une représentation schématique d'un spermatozoïde mature[Zini A and Agarwal, 2011]

3.2 LA SPERMATOGENÈSE

Le processus de différenciation des spermatogonies en des spermatides est connu sous le nom de spermatogénèse. Il s'agit d'un événement complexe par lequel les cellules souches primitives et totipotentes se divisent soit pour se renouveler ou produire des cellules filles qui deviendront un spermatozoïde sur une période de plusieurs semaines. Ce processus débute, chez l'homme, à partir de la puberté et se poursuit durant toute sa vie (Figure 7). La spermatogénèse implique à la fois la mitose et la méiose ainsi qu'un remodelage cellulaire important. La spermatogénèse peut être divisée en trois grandes phases : une phase de multiplication, une phase de méiose et une phase de différenciation appelé spermiogénèse. À la fin, le spermatozoïde acquit son pouvoir fécondant au niveau de l'épididyme [Guérin, 2016].

3.2.1 La phase de multiplication

Commence pendant la vie fœtale et s'accélère à partir de la puberté. Dans le tube séminifère, les cellules germinales sont disposées en séquence hautement ordonnée de la membrane basale à la lumière (voir Fig. 4-2). Les spermatogonies reposent directement sur la membrane basale, suivie des spermatocytes primaires, des spermatocytes secondaires et des spermatides au fur et à mesure qu'ils progressent vers la lumière. La barrière de jonction serrée soutient les spermatogonies et les spermatocytes précoces dans le compartiment basal et toutes les cellules germinales subséquentes dans le compartiment luminal [Desai et al., 2017].

Les spermatogonies représentent des cellules qui se divisent en mitose, fournissant à la fois une population de cellules souches en renouvellement ainsi que des spermatogonies qui s'engagent à entrer dans le processus méiotique. Il s'agit de cellules diploïdes, arrondies, d'un diamètre de 10 à 15µm, avec un

cytoplasme clair et un noyau ovoïde. Les cellules germinales sont classées par leur aspect morphologique ; il y a les spermatogonies Ad : ont une chromatine dense d'aspect sombre (dark), les spermatogonies Ap : ont une chromatine poussiéreuse claire (pâle) et les spermatogonies B : ont une chromatine mottée et irrégulière (Figure 3) [de Kretser et al., 2016]

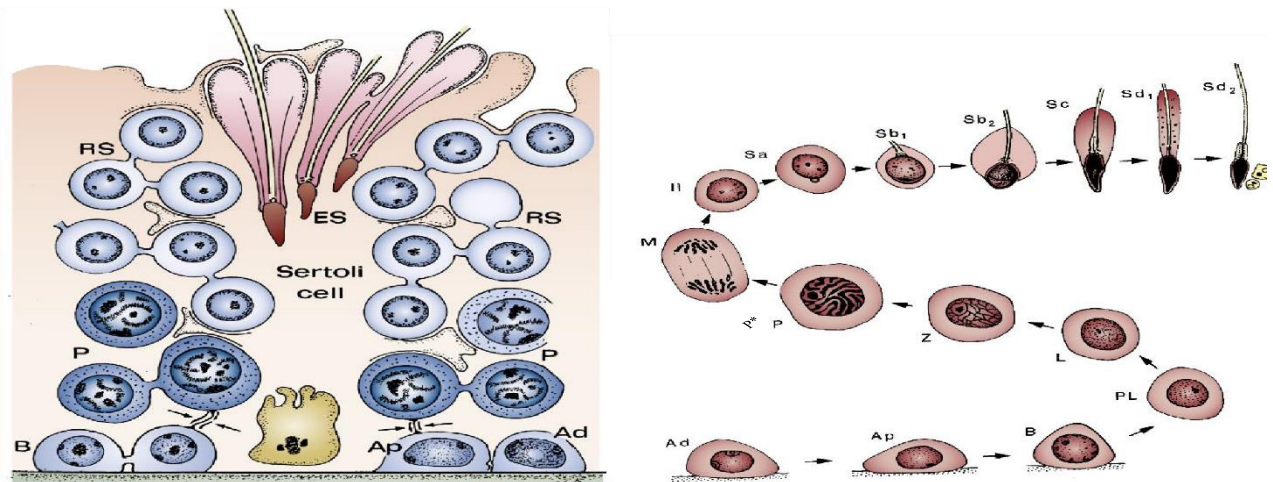


Figure 7: Epithélium séminifère humain et développement des cellules germinales [de Kretser et al., 2016].

a) L'épithélium séminifère humain montre la relation entre les cellules de Sertoli et la position des cellules germinales. Les jonctions serrées entre les cellules de Sertoli sont indiquées par des flèches. b) Développement d'une cellule germinale en un spermatozoïde hautement différencié. Ap :spermatogonies de type A pâle ; Ad: spermatogonies de A dense ; B : spermatogonies de type B ; P : spermatocytes primaires ; RS : spermatides rondes ; ES : spermatides allongées ; PL : préleptotène, L : leptotène ; Z : zygotène, P* : pachytène ; M : division méiotique ; II : spermatocytes secondaires ; Sa, Sb1, Sb2, Sc, Sd1, Sd2 : spermatozoïdes ; RB : corps résiduel

3.2.2 La phase de méiose

La méiose est un processus complexe avec des mécanismes de régulation spécifiques qui lui sont propres [Adachi et al., 1989]. Le processus commence lorsque le type B des spermatogonies perd leur contact avec la membrane basale pour former des spermatocytes primaires préleptotènes. Ainsi, chaque spermatocyte primaire peut théoriquement produire quatre spermatozoïdes, bien qu'il en résulte moins, car certaines cellules germinales sont perdues en raison de la complexité de la méiose. Les spermatocytes primaires sont les plus grandes cellules germinales de l'épithélium germinifère.

La méiose est caractérisée par une prophase, une métaphase, une anaphase et une télophase. Par ailleurs, deux divisions cellulaires successives donnent quatre spermatozoïdes haploïdes à partir d'un spermatocyte primaire diploïde. Les cellules filles ne contiennent que la moitié du contenu chromosomique de la cellule mère.

Après la première division méiotique, chaque cellule fille contient un chromosome de la paire de chromosomes homologues, et elles sont appelées spermatocytes secondaires. Ces cellules entrent rapidement dans la deuxième division méiotique, dans laquelle les chromatides se séparent ensuite au centromère pour donner des spermatozoïdes haploïdes. La méiose assure la diversité génétique et implique les spermatocytes primaires et secondaires, qui donnent naissance aux spermatozoïdes (Figure 8).

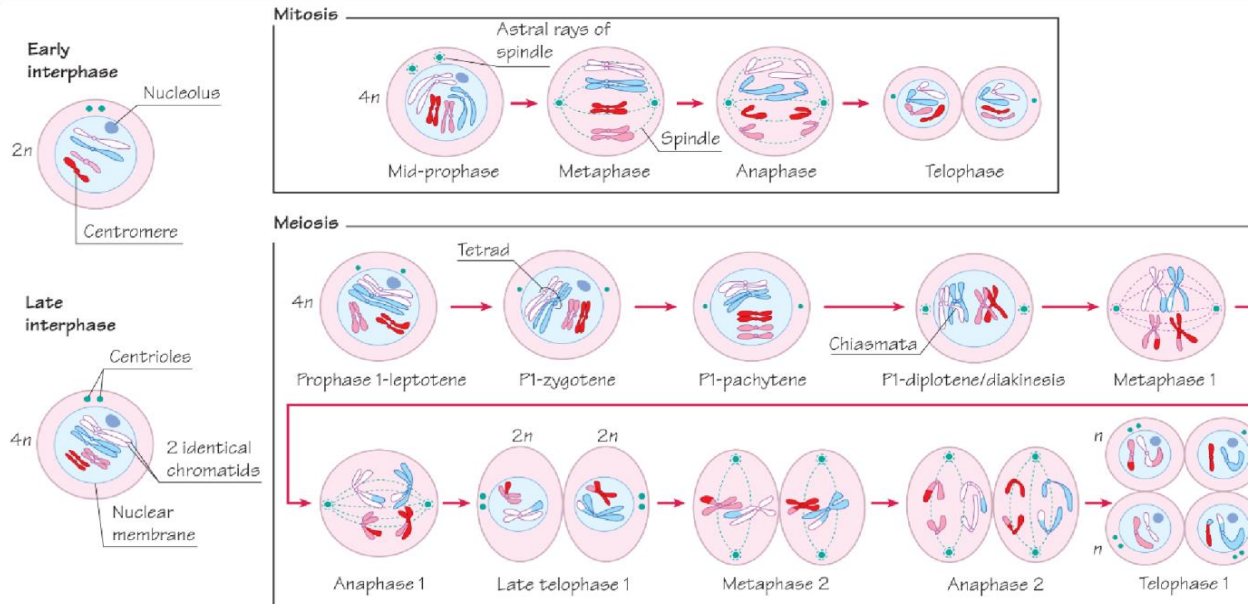


Figure 8: Représentation schématique de la mitose et la méiose des cellules humaines [Heffner and Schust, 2014]

3.2.3 La phase de différenciation

La différenciation post-méiotique des spermatides en spermatozoïdes est appelée la spermiogenèse. Chez l'homme, elle dure environ 23 jours et peut-être divisée en 8 étapes, il constitue un processus de différenciation au cours duquel la cellule germinale acquiert, par des transformations cellulaires successives, ses spécificités. Ces transformations portent sur l'ensemble des constituants cellulaires, aboutissant à la libération des spermatozoïdes à la surface des cellules de Sertoli, dans la lumière du tube séminifère (Figure 9). Elle est caractérisée par :

- La condensation du noyau : la chromatine de la spermatide se condense progressivement et sa membrane présente un épaississement au niveau des deux pôles opposés. Le noyau s'allonge progressivement et se place en position sous-membranaire.
- La formation de l'acrosome : Il se développe à partir de vésicules dites *pro-acrosomiques* qui se détachent de l'appareil de Golgi, fusionnent pour donner une vésicule unique, qui s'étale au contact du noyau. Il contient des enzymes protéolytiques indispensables à la traversée de la zone pellucide de l'ovocyte au moment de la fécondation.
- La formation du flagelle : le centriole distal est à l'origine du flagelle. Le flagelle se constitue par l'allongement progressif du complexe axonémal et des fibres denses entourés par un mince film cytoplasmique et la membrane plasmique.

Au stade terminal, des expansions des cellules de Sertoli pénètrent dans la zone périphérique du cytoplasme, progressivement éliminées par un double processus de fragmentation et de phagocytose. Ces ponts cytoplasmiques retiennent les cellules germinales matures à la surface des cellules de Sertoli; à la fin de la spermiogenèse, la destruction de ces ponts cytoplasmiques permet la libération des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère.

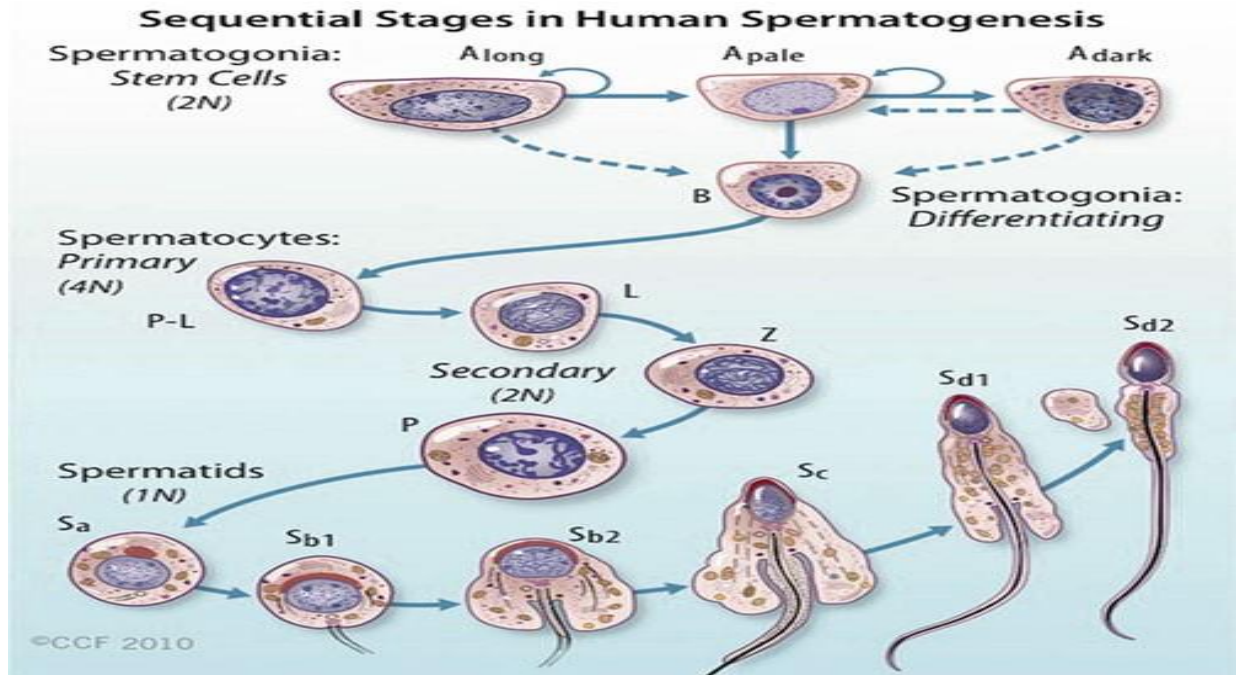


Figure 9: Différenciation d'une cellule germinale diploïde humaine en un spermatozoïde entièrement fonctionnel [Zini A and Agarwal, 2011]

3.2.4 La maturation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes libérés dans l'épididyme ne sont pas fonctionnellement matures. La maturation et la capacitation sont nécessaires avant la fécondation :

❖ La maturation épидидymaire

Lorsque les spermatozoïdes traversent l'épididyme, ils sont exposés constamment à un milieu en perpétuel évolution du liquide luminal dérivé du rete testis et modifié par l'activité sécrétoire et absorbante de l'épithélium épидидymaire. Chez les mammifères, il existe des preuves irréfutables que cet épithélium fournit des facteurs essentiels pour la maturation des spermatozoïdes [Bedford, 1967; Orgebin-Crist, 1967]. C'est à ce niveau que les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité, Il est limité à un rôle de stockage car les spermatozoïdes qui n'ont jamais traversé l'épididyme et qui ont été obtenus des canaux efférents chez les hommes avec absence congénitale du canal déférent peuvent féconder l'ovocyte humain in vitro et entraîner une grossesse avec l'obtention de naissance vivante [Moore and al., 1992].

❖ La capacitation

Au moment de l'éjaculation, les spermatozoïdes sont mélangés aux sécrétions des différentes glandes accessoires et déposés autour de l'orifice cervical externe et dans le fornix postérieur du vagin. Les spermatozoïdes de la première fraction de l'éjaculat ont une motilité et une survie significativement meilleures que les derniers. La majorité des spermatozoïdes pénètrent dans la glaire cervicale dans les 15 à 20 minutes suivant l'éjaculation [Tredway et al., 1975]. La capacité de migrer à travers l'interphase sperme-mucus est hautement en fonction des mouvements spécifiques des spermatozoïdes [Mortimer, 1990]. La sélection des spermatozoïdes en normaux et anormaux se fait en fonction de leur motilité. Ceci est encore modifié une fois que le spermatozoïde «d'avant-garde» se trouve dans la glaire cervicale [Mortimer, 1990].

La réceptivité de la glaire cervicale à la pénétration par les spermatozoïdes est cyclique, elle augmente sur une période d'environ 4 jours avant l'ovulation et diminue rapidement après. La réceptivité maximale est observée la veille et le jour du pic de LH [Mortimer, 1983].

La capacitation représente un changement dans l'organisation moléculaire de la membrane plasmique intacte du sperme qui est caractérisée par la capacité de subir la réaction acrosomique, de se lier à la zone pellucide et d'acquérir une hypermotilité. Elle implique l'élimination des facteurs plasmatiques séminaux qui recouvrent la surface du spermatozoïde ; la modification de la membrane spermatique, les stéroïdes, les lipides et les glycoprotéines et la membrane de l'acrosome externe se trouvant immédiatement en dessous. Cela implique également une augmentation du calcium intracellulaire [Thomas et Meizel, 1989].

La capacitation des spermatozoïdes peut être initiée in vivo lors de la migration à travers la glaire cervicale [Overstreet et al., 1991] . La capacitation peut être une conséquence évolutive du développement d'un système de stockage des spermatozoïdes inactifs dans la queue épидидymaire. Habituellement, il faut environ 2 heures pour que les spermatozoïdes subissent une capacitation in vitro. D'autres modifications se produisent lorsque les spermatozoïdes capacités atteignent le voisinage de l'ovocyte.

La réaction acrosomique confère au spermatozoïde la capacité de pénétrer la zone pellucide. Il y a des points de fusion distincts entre la membrane acrosomique externe et la membrane plasmique. La fusion commence en arrière autour du bord antérieur du segment équatorial, qui est toujours exclu de la réaction. Les changements, appelée réaction acrosomique préparent le spermatozoïde à fusionner avec la membrane de l'ovocyte. L'élimination du cholestérol de la surface membranairespermatique prépare celle ci pour la réaction acrosomique [Parks et Ehrenwalt., 1990]. De plus, les lectines liant le D-mannose sont également impliqué dans la liaison du sperme humain à la zone pellucide [Benoff et al., 1993] .Ainsi, ces séries de changements sont nécessaires pour transformer les cellules souches en spermatozoïdes pleinement matures et fonctionnels pour féconder l'ovocyte.

3.3 LA REGULATION DE LA SPERMATOGENÈSE

3.3.1 La régulation hormonale

La régulation hormonale de la spermatogénèse peut varier d'une espèce à l'autre. Au niveau du testicule, les différents types cellulaires sont sous la dépendance des hormones hypophysaires [Amory and Bremner, 2001; Holdcraft and Braun, 2004]. Au niveau de l'hypophyse, l'action pulsatile de l'hormone GnRH hypothalamique (Gonadotropin Releasing Hormone) induit la sécrétion de deux hormones gonadotrophines : FSH et LH. À la puberté, la LH joue un rôle indispensable au démarrage de la spermatogénèse. Elle stimule des récepteurs, appartenant à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G intracellulaire, situés au niveau des cellules de Leydig. Ces dernières, en réponse à ce signal, produisent et sécrètent la testostérone. D'autre part, la prolactine permet une augmentation du nombre de récepteurs LH, et par conséquent, une augmentation de la synthèse de testostérone. Ce dernier est indispensable à l'initiation et au déroulement de la spermatogénèse. Elle régule les fonctions des cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les cellules myoïdes périvitubulaires, qui expriment leurs récepteurs. La

testostérone exerce aussi un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des gonadotrophines, en particulier la LH et la GnRH.

La FSH sécrétée pendant la vie fœtale agit directement sur les cellules de Sertoli en régulant leurs fonctions et leurs structures. Avant la puberté, la FSH stimule la prolifération des cellules de Sertoli. Ceci est indispensable pour la fertilité car c'est le nombre des cellules de Sertoli qui définit le nombre des spermatozoïdes pouvant être produit. À la puberté, la FSH est aussi impliquée dans l'initiation de la spermatogenèse. En effet, la FSH et la testostérone semblent agir en synergie pour contrôler la spermatogenèse. Les cellules de Sertoli sécrètent également l'inhibine qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la FSH. D'autres hormones interviennent également dans la spermatogenèse, notamment, les hormones thyroïdiennes, pancréatiques et surrénaliennes. Les récepteurs de la plupart de ces hormones ont été décrits dans les testicules.

3.3.2 La régulation paracrine

Les facteurs de croissance, constituent des régulateurs sensibles et complexes des fonctions testiculaires, qu'il s'agit de cellules interstitielles, épithéliales ou d'origine séminale. Certains de ces facteurs sont localisés ou produit par les cellules de Sertoli, y compris l'inhibine, l'activine, l'IGF I (Insulin-like growth factor-1), le TGF α (Transforming growth factor alpha) le TGF β (Transforming growth factor beta), l'EGF (Epidermal growth factor) et les interleukines 1 et 6. Ces peptides peuvent agir sur les cellules de la base et/ou des compartiments périphériques de l'épithélium séminifère. Alors que certains facteurs de croissance peuvent agir exclusivement sur les cellules situées à l'intérieur du compartiment central, d'autres peuvent interagir avec les cellules, à la fois somatiques et germinales, dans le compartiment périphérique, ou sur les cellules cibles situées dans des régions plus distales de l'appareil reproducteur. De même, les facteurs de croissance connus pour être exprimée par les cellules germinales, comme le β -NGF, pourraient agir sur les cellules somatiques ou sur des cibles impliquées dans la voie de la fécondation [Bellvé and Zheng, 1989].

4 LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRÉCOCE

En général, il y a 6 jours en moyenne dans le cycle menstruel d'une femme que les rapports sexuels peuvent entraîner une grossesse; les 5 jours avant l'ovulation et le jour de l'ovulation sont conjointement appelés «la fenêtre fertile».

La fécondité est définie comme la capacité de produire une descendance ou la probabilité qu'un couple conçoive dans un cycle menstruel. Il peut être mesuré en évaluant le délai de conception. La fécondité est influencée par un grand nombre de facteurs tels que la fréquence des rapports sexuels, la régularité du cycle menstruel, le nombre des spermatozoïdes, l'âge maternel, l'indice de masse corporelle et l'utilisation récente de contraceptifs oraux. Un mode de vie malsain (tabagisme, alcool, la consommation de thé/café) est lié à une réduction de la fécondité.

Globalement, le taux de fécondité moyen par cycle chez l'Homme est d'environ 15 à 20% avec un maximum de 30 à 40%, ce qui n'est atteint qu'au cours des premiers cycles, y compris les grossesses non

viables. Environ 55 à 65% des couples parviendront à une grossesse au cours des 3 premiers cycles et 80 à 90% au cours des 12 premiers cycles. Bien que la probabilité d'une grossesse spontanée diminue avec la durée d'une hypofertilité inexpliquée, la plupart des couples finiront par concevoir naturellement. En fin de compte, 3 à 5% des couples auront une infertilité définitive (incapacité à concevoir).

4.1 LA FECONDATION

Le développement d'un être humain commence à partir d'une seule cellule, un zygote diploïde, qui résulte de la fécondation d'un ovule par un spermatozoïde. La fécondation se produit dans la trompe de Fallope dans les 48 heures suivant l'ovulation. Le zygote subit une série de divisions de clivage, augmentant le nombre de cellules, appelées blastomères, sans modifier le volume global de l'embryon. Après clivage, l'embryon subit une compaction, par laquelle les blastomères adhèrent les uns aux autres pour former une masse de 12 à 16 cellules totipotentes, la morula, qui est toujours enfermée dans la zone pellucide [Norwitz et al., 2001; Sariola et al., 2003]. La morula pénètre dans la cavité utérine environ trois jours après la fécondation. A ce stade, les cellules externes se polarisent tandis que les cellules internes restent apolaires. Par la suite, un événement morphologique appelé ; cavitation se produit conduisant à la formation d'une cavité remplie de liquide, le blastocèle. L'embryon à ce stade est défini comme un blastocyste et s'accompagne d'une différenciation cellulaire [Norwitz et al., 2001; Wang et Dey, 2006].

Le développement préimplantatoire entraîne la formation d'un blastocyste avec trois lignées cellulaires distinctes. Des progrès significatifs ont été réalisés dans notre compréhension des mécanismes régulant la formation de ces trois lignées, principalement à partir des études sur la souris. Le premier événement de différenciation donne naissance à des trophoblastes, des cellules épithéliales spécialisées qui donnent naissance à des structures extra-embryonnaires, y compris le placenta. Les cellules restantes se séparent à un pôle de l'embryon pour former la masse cellulaire interne (MCI). Par la suite, les cellules de celle-ci se séparent dans l'EPI (épi-blaste) pluripotent, ou endoderme primitif (PrE, également connu sous le nom d'hypoblaste), seul l'EPI contribue à l'embryon proprement dit. Dans les trois jours suivant l'entrée dans la cavité utérine, l'embryon éclot de la zone pellucide, exposant ainsi ses cellules trophoblastiques, ce qui permet l'implantation [Gerri et al., 2020 ; Norwitz et al., 2001; Sariola et al., 2003; Wang et Dey, 2006].

4.2 L'IMPLANTATION

Le zygote nouvellement formé, doit se préparer à l'implantation à un laps de temps. La préparation commence après la fécondation de l'ovocyte et dure environ 6 à 7 jours. Pendant ce temps, une division cellulaire successive se produit et les cellules trophoblastiques externes du blastocyste se différencient en cytotrophoblastes qui divergent en sous-types villosités et invasifs formant les éléments constitutifs du placenta [Norwitz et al., 2001; Vitiello et Patrizio, 2007]. Dans le même temps, lorsque le blastocyste se prépare à l'implantation, l'utérus devient réceptif. La réceptivité utérine est définie comme l'état de l'endomètre pendant la période de sa maturation et de sa prolifération lorsque le blastocyste veut s'implanter. De multiples signaux synchronisent le développement du blastocyste et la préparation de

l'utérus. Parmi les nombreux aspects du processus de synchronisation, le rôle des hormones stéroïdes est le mieux compris.

Les hormones peptidiques, les facteurs de croissance et les cytokines jouent également un rôle dans le processus. La cascade d'événements de signalisation qui se produit dans les tissus fœtaux et maternels établit un environnement approprié essentiel au développement et à la survie du fœtus [Norwitz et al., 2001; Wang et Dey, 2006; Vitiello et Patrizio, 2007]. Ainsi, l'implantation se déroule en trois étapes:

- **La première étape** est l'adhésion initiale du blastocyste à la paroi utérine, appelée apposition, elle est instable. Les microvillosités sur la surface apicale des syncytiotrophoblastes s'insinuent avec des microprotrusions de la surface apicale de l'épithélium utérin, appelé pinopodes (Figure 10). L'apposition, et par conséquent l'implantation, se produit plus souvent dans la paroi postérieure-supérieure (fond) de l'utérus.

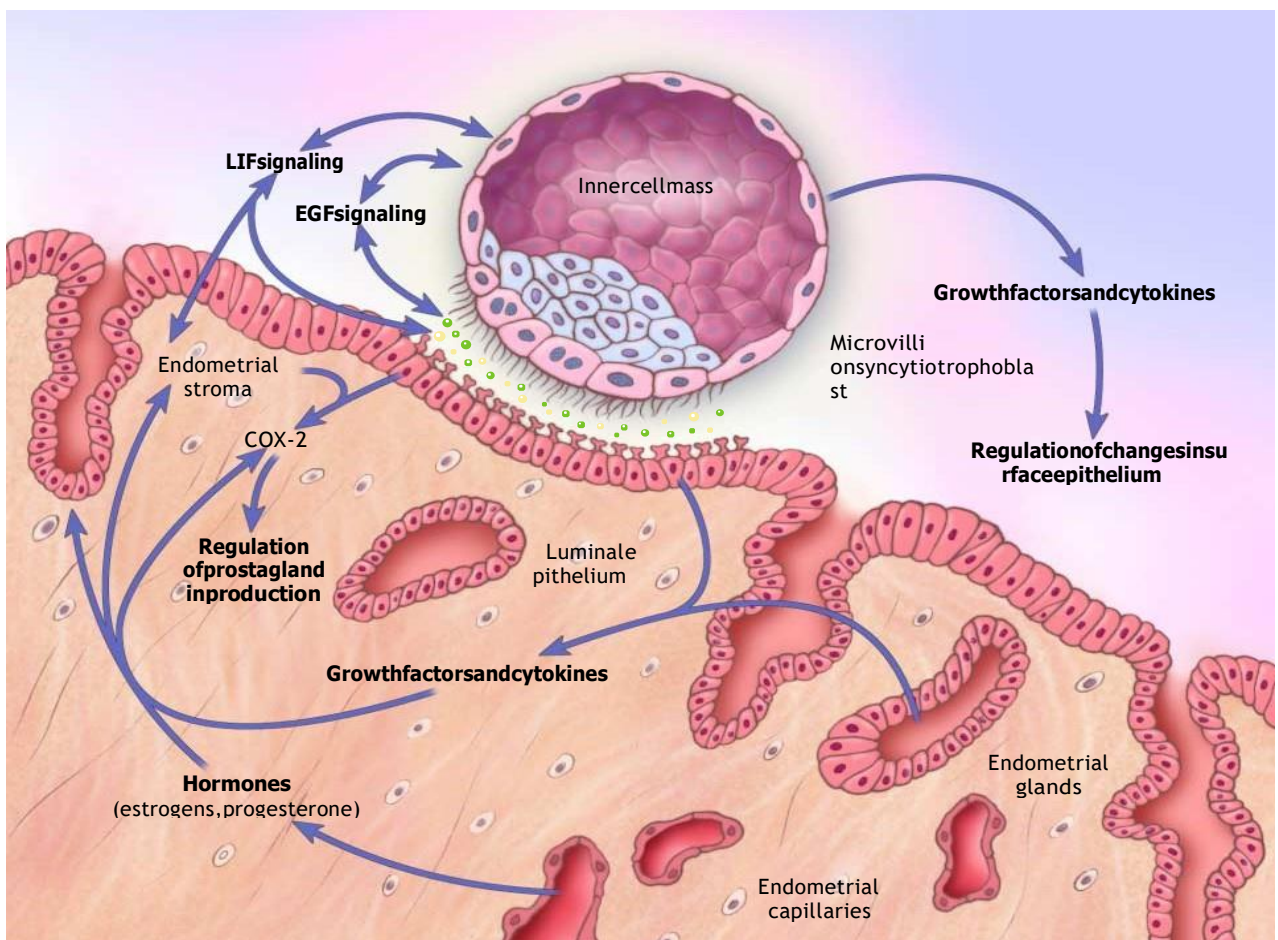


Figure 10: Apposition et adhésion des blastocystes [Norwitz et al, 2001]

Le blastocyste au stade préimplantatoire (environ six à sept jours après la conception) et les processus jugés nécessaires à la réceptivité utérine et à l'apposition et à l'adhésion du blastocyste. COX-2 désigne la cyclooxygénase-2, le facteur de croissance épidermique EGF et le facteur d'inhibition de la leucémie LIF.

- **L'étape suivante** est caractérisée par une interaction physique accrue entre le blastocyste et l'épithélium utérin. Peu de temps après, l'invasion commence et les syncytiotrophoblastes (la couche externe du trophoblaste), pénètre dans l'épithélium utérin (Figure 11). À ce moment-là, le blastocyste

est orienté avec son pôle embryonnaire vers l'épithélium utérin. [Wang et Dey, 2006; Chavatte-Palmer et Guillomot, 2007; Vitiello et Patrizio, 2007]. Le 10^{ème} jour après la conception, le blastocyste est complètement incrusté dans le tissu stromal de l'utérus car l'épithélium utérin a été repoussé pour recouvrir le site d'implantation [Norwitz et al., 2001]. L'interaction entre un blastocyste activé et un utérus réceptif fait partie d'un processus complexe qui conduit à l'implantation et aux premiers stades du développement placentaire. L'absence de synchronisation des processus impliqués dans ces interactions entraîne l'échec de l'implantation [Cross et al., 1994; Wang et Dey, 2006; Chavatte-Palmer et Guillomot, 2007].

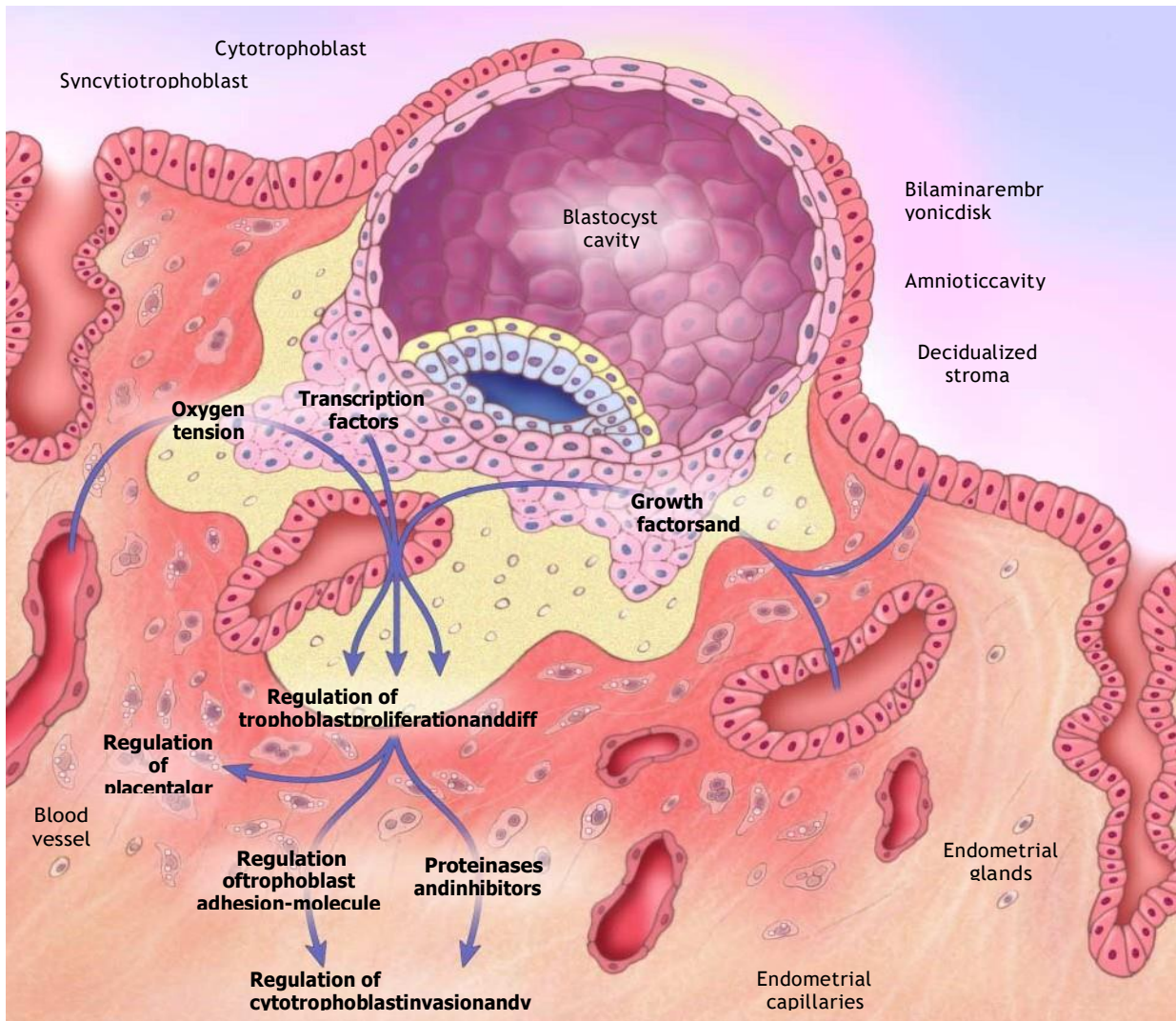


Figure 11: Implantation du blastocyste [Norwitz et al, 2001]

Un blastocyste envahissant (environ 9 à 10 jours après la conception) et les processus nécessaires à l'invasion du trophoblaste.

4.3 LA PLACENTATION

Le placenta est le premier organe à se former lors de l'embryogenèse chez les mammifères. Le placenta est un organe vital sans lequel l'embryon ne peut survivre dans l'environnement utérin. La fonction du placenta au début de la gestation est principalement de médier l'implantation de l'embryon dans l'utérus. Après l'implantation, la fonction principale du placenta est de réguler, l'absorption des nutriments de la mère par

le fœtus, il établit également l'interface pour l'échange de gaz entre la circulation maternelle et fœtale. Une autre fonction importante du placenta est la régulation de la réponse immunitaire maternelle afin que la semi-allogreffe fœtale soit tolérée pendant la grossesse. Le placenta agit également comme une source importante d'hormones et de facteurs de croissance nécessaires à la reconnaissance maternelle initiale de la grossesse [Cross et al, 1994; Cross, 2006; Sadler et al., 2006].

Le placenta étant essentiel à la survie, il est très sensible aux perturbations. Les facteurs génétiques ou environnementaux qui affectent le développement du placenta sont associés à de mauvais résultats obstétricaux. L'expression anormale de gènes régulateurs spécifiques dans le placenta et les fonctions anormales des gènes peuvent provoquer un dysfonctionnement placentaire [Coan et al., 2005]. Les anomalies des fonctions placentaires peuvent entraîner divers problèmes, notamment l'échec de l'implantation, l'insuffisance placentaire, le retard de croissance fœtale et la mort embryonnaire. Les complications qui apparaissent relativement tard dans la grossesse peuvent en fait refléter des erreurs qui se sont déjà produites pendant le développement placentaire [Cross et al, 1994; Rossant et Cross, 2001; Cross, 2006].

4.4 LA GASTRULATION ET L'ORGANOGENÈSE

Alors que le syncytiotrophoblaste commence à pénétrer dans la paroi de l'utérus lors de l'implantation, l'embryoblaste/MCI continue également à se développer. L'embryoblaste forme un embryon bilaminaire, composé de l'épiblaste et de l'hypoblaste. L'hypoblaste forme le sac vitellin, l'épiblaste subit une gastrulation à environ 16 jours après la fécondation. La gastrulation établit les trois couches germinales - l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme - qui donneront tous naissance à divers systèmes d'organes. Le mésoderme interagit également avec le tissu trophoblastique pour former le cordon ombilical [Cross et al, 1994; Sadler et al., 2006]. À ce stade, la phase embryonnaire proprement dite commence et dure de la troisième semaine jusqu'à la huitième semaine après la fécondation.

Les systèmes d'organes se différencient à des vitesses très variables au cours de cette phase. Par exemple, le système circulatoire est largement fonctionnel à la fin de cette période, tandis que le système nerveux continue de subir des divisions cellulaires massives et commence seulement à établir des connexions fonctionnelles [Sadler et al., 2006]. Le reste du développement Humain, de la 9^{ème} à la 38^{ème} semaine est appelé la période fœtale durant laquelle l'embryon acquiert son apparence humaine. Elle est caractérisée par une croissance rapide et une différenciation continue des tissus et des organes [Sariola et al, 2003; Sadler et al, 2006].

4.5 LA GROSSESSE NORMALE

La grossesse est l'état d'être enceinte. La gestation s'étend de la fécondation à la fin du travail (accouchement)(Figure 12). La grossesse dure en moyenne de 280 à 290 jours à partir du premier jour de la dernière période menstruelle (LDR). L'unité de mesure la plus utilisée aujourd'hui est la semaine. Une grossesse est estimée à terme entre 37 semaines d'aménorrhée (SA) à 41 semaines + 6 jours. Les premiers

signes de grossesse sont des règles retardées, des nausées et une sensibilité des seins, connus sous le nom de signes sympathiques de la grossesse, après quoi les femmes subissent généralement un test ou une échographie pour confirmer la grossesse. On distingue trois périodes :

- la période pré-embryonnaire, de la fécondation jusqu'à la fin de la 5^{ème} semaine d'aménorrhée (SA) ;
- la période embryonnaire, de la 6^{ème} SA à la fin de la 10^{ème} SA ;
- et la période fœtale, à partir de la 11^{ème} SA.



Figure 12: Foetus au début de son développement intra-utérin

4.6 CONFIRMATION DE LA GROSSESSE

4.6.1 Test de grossesse

Les tests de grossesse sont conçus pour démontrer la présence d'hormone chorionique gonadotrope (hCG), qui est une glycoprotéine constituée de deux polypeptides liés de manière non covalente, les sous-unités alpha (α) et bêta (β). L'hCG a la même sous-unité alpha que d'autres hormones, telles que l'hormone folliculo-stimulante (FSH), l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone stimulante thyroïdienne (TSH) [Ganrot et al., 2003; Khan et al., 1989]. L'unité β est unique, par conséquent, la sous-unité bêta de l'hCG est plus spécifique pour diagnostiquer une grossesse dans les urines ou dans le sang que la sous-unité alpha [Khan et al., 1989]. Chez la femme enceinte, la circulation de β -hCG peut être détectée, le 21^{ème} jour après la dernière menstruation, soit 7 jours après la conception [Chard, 1992].

Pendant la grossesse, la gonadotrophine est produite à partir du trophoblaste et libérée dans la circulation maternelle. La fonction principale de l'hCG est de soutenir les cellules du corps jaune dans la production de progestérone pendant les premières semaines de la grossesse, empêchant ainsi les menstruations [Brody et Frank, 1993; Ganrot et al., 2003].

La β -hCG est détectée dans les tests de grossesse, le bâtonnet-test est plongé dans l'urine ou quelques gouttes d'urine sont déposées sur une membrane. Après quelques minutes, la réponse est positive ou négative. Le mode d'emploi est souvent indiqué sur l'emballage, un test positif est un niveau de β -hCG supérieur à un certain niveau déterminé par le fabricant (Figure 13), le jour du retard de règles, la concentration de β -hCG est de 100UI/l dans le plasma. Afin de détecter une grossesse ce jour-là, un test de

grossesse nécessite une sensibilité de 20 mUI/mL (Cole et al, 2004). Les niveaux maximaux peuvent être détectés 60 à 80 jours après la conception [Ganrot et al, 2003]. Dans une grossesse normale, l'hCG double toutes les 48 à 72 heures entre les semaines de gestation 4 et 8 (Scott, 2000) (Tableau 1).

Tableau 1: Valeur β -hCG au cours de la grossesse

Valeur β -HCG mUI/ml	Jours	Semaines
100	23	3,3
250	28	4,0
1000	35	5,0
4000	42	6,0
15000	49	7,0

Le test de grossesse à domicile a été introduit en 1975. La première marque de test, a analysé les deux sous-unités α et β à la fois ce qui a donné des tests faussement positifs à l'ovulation, en raison du pic de LH qui a également des unités α -hCG. La sensibilité du premier test était d'environ 2000U. Par la suite, lorsque des tests plus spécifiques ont été introduits, le seuil de β hCG est 500U et il est à 20U aujourd'hui. Il existe désormais plus de 20 marques de test de grossesse à domicile. Ceux-ci sont capables de donner un test positif le premier jour suivant le retard de règle [Cole et al., 2004]. Les tests urinaires de grossesse peuvent donner des résultats faussement positifs ou faussement négatifs. La valeur normale de β -HCG chez les femmes non enceintes est inférieure à 5 UI/l.



Figure 13: Le bâtonnet-test de grossesse urinaire

4.6.2 Examen clinique

Il existe plusieurs raisons pour lesquelles les femmes sont examinées par un médecin au début de la grossesse, soit dans le cadre d'un examen de routine, l'anxiété, des signes sympathiques de grossesse exagérés ou bien dans le cadre d'une complication à savoir une menace d'avortement ou un avortement.

4.6.3 Ultrasonographie

L'échographie est une machine à ultrasons, elle émet des ultrasons à haute fréquence qui rebondissent sur les structures du corps et, au moyen d'une analyse informatique, une image est créée à l'écran [Hart, 2005] (Figure 14). L'échographie vaginale a un transducteur d'échographie interne inséré dans le vagin, se rapprochant ainsi de l'utérus de la femme mieux que la technique transabdominale conventionnelle. La femme est examinée en position allongée, en position de lithotomie. Le transducteur est une longue sonde, recouverte d'un préservatif et d'un lubrifiant avant l'insertion dans le vagin. Le médecin déplacera la sonde

dans la cavité vaginale pour balayer les structures pelviennes, l'examen est effectué à une vessie vide. Il peut y avoir un léger inconfort dû à la pression de la sonde vaginale [Hart, 2005].

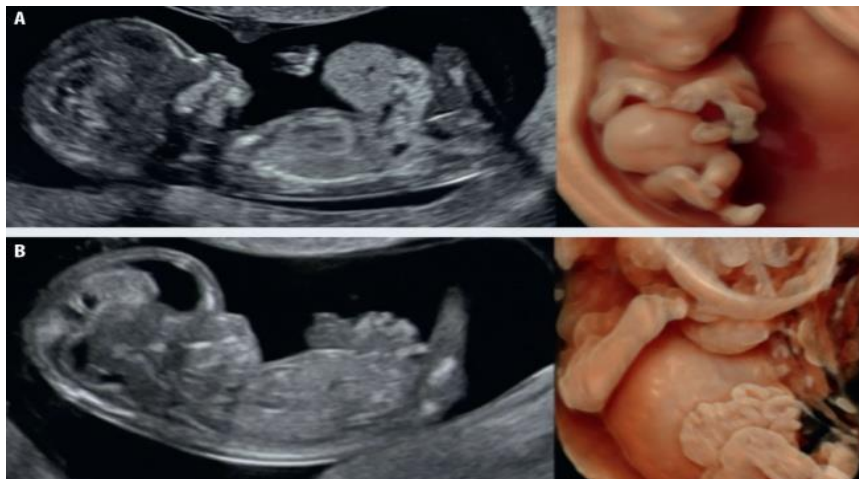


Figure 14: Image échographique d'un fœtus au premier trimestre de grossesse

Au cours de la grossesse, trois échographies de dépistage anténatal seront proposées en cas d'évolution normale : au premier, au deuxième et au troisième trimestre de la grossesse (11 à 13 SA, 22 à 24 SA, 32 à 34 semaines d'aménorrhée). L'échographie permet d'obtenir certaines informations qu'aucun autre examen ne peut fournir : par exemple l'âge exact de la grossesse, le nombre des fœtus, la mesure de la clarté nucale, la morphologie du fœtus (recherche de malformation) (Photographie 1), sa croissance et la localisation placentaire.



Photographie 1 : jumeau malformé à 23 SA (diagnostiqué à l'échographie morphologique)

4.7 ISSU DE LA GROSSESSE

4.7.1 Accouchement à terme

L'évolution normale d'une grossesse est de donner naissance, une fois arrivée à terme, à un nouveau né en bonne santé, ayant hérité la moitié du patrimoine génétique de chacun de ses parents, soit par voie basse (voie vaginale) ou voie haute (césarienne) selon les conditions obstétricales de chaque parturiente.

4.7.2 Echecs de la grossesse

Il a été constaté que seulement 22% des cycles susceptibles d'évoluer vers une grossesse ont abouti à une naissance vivante. Des études plus récentes ont indiqué que même lorsque les circonstances de la

conception sont jugées optimales, les chances maximales de concevoir, et d'obtenir une grossesse cliniquement reconnue en un cycle est d'environ 30% [Ziameen et al., 1996 ; Slama et al., 2002] , s'élevant à 40% chez les jeunes femmes subissant une insémination programmée avec du sperme de donneurs et dont la fertilité est prouvée [Van Noord-Zaadstra et al., 1991]. La grossesse peut être perdue ou échouée à n'importe quel moment entre la fécondation et l'implantation, ou au delà jusqu'au terme. Une partie de ces pertes est cliniquement reconnue sous forme d'avortement. Cependant, depuis le premier cas rapporté de fausse couche par mesure de l'HCG [Morris and Udry, 1967], il est devenu clair qu'un grand nombre de conceptions échoue avant même que la femme ne reconnait qu'elle est enceinte. La perte de grossesse est une formule générale correspondant à une interruption de la grossesse quel qu'en soit le terme. Elle regroupe des entités nosologiques bien distinctes : les fausses couches précoces, les fausses couches tardives, la mort fœtale in utero (MFIU). Ainsi, les échecs de grossesse affectent l'une des trois périodes : pré-embryonnaire, embryonnaire et fœtale. Environ 87% des échecs ont lieu durant les 70 jours suivant les dernières menstruations, c'est-à-dire durant les périodes pré-embryonnaire et embryonnaires. Ainsi, on distingue :

➤ **Les pertes fœtales au 1^{er} trimestre**

La fausse couche spontanée précoce est l'arrêt spontané de la grossesse avant la 14^{ème} SA. Cette définition englobe les grossesses dites «biologiques», non identifiées en échographie mais plutôt avec un test β -HCG plasmatique positif, ainsi que les œufs clairs (sac gestationnel sans embryon visualisé à l'échographie). Le risque de fausses couches (FC) est de l'ordre de 11,1% pour la tranche d'âge 20–24ans, de 50% pour les femmes entre 40 et 44ans et de plus de 80% après 45 ans [Nybo Andersen et al, 2000]. Les arrêts très précoces, au cours des trois premières semaines de gestation, concernent jusqu'à la moitié des conceptions.

La fréquence des FCS à répétition est variable selon la définition retenue (deux ou trois FCS consécutives), mais celles-ci touchent en moyenne 1 à 2% des couples [Berry et al., 1995]. Plus le nombre d'avortements spontanés consécutifs augmente, plus le risque de récurrence est important : autour de 17 à 35% après deux FCS, 25 à 46% après trois FCS et plus de 50% après six FCS, toutes les causes confondues [Ogasawara et al, 2000]. Néanmoins, dans le cadre des FCS idiopathiques, le taux de grossesse évolutive après trois FCS consécutives est proche de 80% à 30ans et de 50% à 45ans [Brigham et al, 1999].

➤ **Les pertes fœtales tardives**

- **La fausse couche tardive** est l'expulsion d'un fœtus non viable entre 14SA et 22SA ou d'un poids inférieur à 500g (critères de viabilité de l'Organisation Mondiale de la Santé) (Photographie 2). Ses étiologies sont distinctes de celles des FCS précoces et plus proches de celles des accouchements prématurés. Beaucoup moins fréquentes que les FCS précoces, elles correspondent à environ 0,5% des grossesses [Muller et al, 2002].



Photographie 2: Fœtus malformé macéré (17 SA)

- **La mort fœtale in utero (MFIU)** est définie par l'arrêt de l'activité cardiaque fœtale après le 2^{ème} trimestre de la grossesse. Sa fréquence est d'environ 0,8 à 1% dans les pays développés. Après 37SA, le risque est d'environ 2 pour 1000 grossesses et il augmente régulièrement entre 40 et 43SA[Cotzias et al, 1999].Les étiologies des pertes fœtales diffèrent selon le terme. Ainsi, un bilan étiologique s'avère nécessaire pour mieux traiter ces couples et à fin d'éviter les récives.

LES AVORTEMENTS SPONTANES PRECOSES

1 DEFINITION

L'avortement spontané et fausse couche sont deux termes synonymes. Dans la littérature médicale, l'avortement spontané est le plus souvent utilisé, tandis qu'en pratique clinique et dans la population générale, la fausse couche est le terme préféré. Selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS-1977), l'avortement spontané est défini comme l'expulsion d'un embryon ou l'extraction d'un fœtus pesant 500g ou moins. Ce poids fœtal correspondra normalement à un âge gestationnel de 20 à 22 semaines d'aménorrhées. Un avortement précoce survient avant 12 semaines de gestation et un avortement tardif entre 13 et 22 semaines.

- Dans une «**fausse couche complète**», le produit de conception est expulsé dans son intégralité ;
- Dans une «**fausse couche incomplète**», le produit de conception n'est pas expulsé en totalité ;
- Dans un «**avortement manqué**», une interruption de grossesse a lieu mais rien ni expulsé, parfois il s'agit d'un œuf clair.

La définition d'une fausse couche manquée (avortement manqué) peut différer à la fois géographiquement et historiquement. Auparavant, le terme d'avortement manqué était utilisé lorsque la mère ne ressentait aucun mouvement fœtal, ou lorsqu'il y a une absence de croissance du fœtus, diagnostiquée par une petite hauteur utérine par rapport au terme de la grossesse. Cela pourrait signifier une longue attente incertaine pour la femme. Dans la pratique clinique actuelle, un fœtus sans viabilité, comme le montre l'échographie, est généralement diagnostiqué comme un avortement manqué. La femme ne présente souvent pas de signe ou seulement un saignement vaginal, souvent avec perte de nausées et de tension mammaire [Brody et Frank, 1993; Hart, 2004]. L'avortement spontané récurrent est défini comme trois pertes de grossesse consécutives ou plus avant 22 semaines de gestation, survenant généralement au cours de la même semaine de gestation [Jablonowska et al, 2003].

2 CLASSIFICATION

- ❖ **L'avortement au premier trimestre** est défini comme un avortement qui survient dans les 12 semaines suivant la gestation. L'œuf clair est un type de fausse couche très courant qui représente 60% des fausses couches du premier trimestre. Il est également connu comme un sac gestationnel vide. Cela se produit lorsqu'un ovule fécondé se fixe avec succès à la paroi utérine mais ne contient aucun embryon. Tout ce qui se forme est un placenta et un sac vide [Tucker et al, 1997].
- ❖ **La grossesse biochimique** est également une fausse couche du premier trimestre qui survient lorsque le fœtus décède immédiatement après la conception. Cela se produit avant que l'embryon n'ait la possibilité de s'implanter dans la paroi utérine. Il produit un test de grossesse positif (β HCG +) mais n'est pas vu à l'examen échographique.

Une perte fœtale survient lorsque le fœtus est décédé dans les 8 à 12 semaines d'aménorrhées suivant la gestation sans activité cardiaque [Quenby, 2007].

- ❖ **L'avortement au deuxième trimestre** est défini comme une perte de grossesse entre 12 et 24 semaines de gestation [Baker et Monga, 2006]. Cependant, ce n'est pas aussi courant qu'une fausse couche au premier trimestre. C'est une perte de grossesse avec rupture spontanée des membranes ou dilatation cervicale. Le fœtus a entre 12 et 24 semaines de gestation et a eu une activité cardiaque fœtale [Quenby, 2007]. Le taux de perte de grossesse diminue au fur et à mesure que la grossesse progresse. Environ 1 à 5% des grossesses sont perdues entre 13 et 19 semaines de gestation, et 0,3% entre 20 à 27 semaines de gestation, et à un taux similaire au troisième trimestre.

3 ÉPIDEMIOLOGIE DES FAUSSES COUCHES

Dans la population générale, presque 15% de toutes les grossesses cliniquement reconnues se terminent par une fausse couche [Stray-Pederson et Stray-Perderson, 1984; Nybo Andersen et al., 2000]. Cependant, le taux de fausses couches peut atteindre 50 à 60% si l'on tient compte des pertes de grossesses très précoces non détectées survenant dans les premières semaines suivant la gestation [Roberts et Lowe, 1975; Wilcox et al., 1988]. Parmi les grossesses perdues, environ 70 à 75% sont causées par des échecs d'implantation ou de placentation précoce et ne sont donc pas cliniquement reconnues comme des grossesses. En conséquence, seulement la moitié environ de toutes les conceptions évolue vers le deuxième trimestre de la grossesse [Rai et Regan, 2006].

On estime que 1 à 2% de tous les couples ont eu des fausses couches à répétition (FCR) [Tulppala et al, 1993; Katz et Kuller, 1994], mais la prévalence exacte des FCR dépend de sa définition. L'avortement spontané à répétition (ASR) est souvent défini comme la survenue d'au moins trois échecs de grossesse consécutifs et cliniquement détectables avant la 20^{ème} semaine de gestation [Li et al, 2002b; Quenby et al., 2002; Pandey et al., 2004]. Cependant, certaines études ont également inclus des patientes avec deux fausses couches [Laskin et al., 1997; Stephenson et al., 1998] et dans certaines études, les fausses couches n'étaient pas nécessairement consécutives. Cela augmente la prévalence des ASR jusqu'à 5% de tous les couples tentant de concevoir [Rai et Regan, 2006].

L'analyse des aneuploïdies, des translocations et d'autres aberrations chromosomiques de structure a grandement aidé à déterminer l'étiologie dans la majorité des cas d'ASR. La perte précoce de grossesse au cours du premier trimestre est la complication la plus courante affectant au moins 15 à 20% des grossesses cliniquement reconnues [Boue et al., 1985]. Les grossesses perdues en fin de gestation ont également un taux élevé d'anomalies chromosomiques, environ 30% au deuxième trimestre et 5% au troisième trimestre [Lee et Silver, 2000].

Chez une patiente ayant des antécédents de deux fausses couches, le risque ultérieur de perte de grossesse s'élève à environ 25%, tandis que trois avortements augmentent le risque d'une quatrième fausse couche à 33%. Cependant, il n'y a pas de seuil précis pour le nombre d'avortements spontanés qui justifie sans équivoque une évaluation. Il n'est pas rare que des couples en parfaite santé connaissent trois pertes de grossesse spontanées consécutives, chacune pour une raison différente et il a été constaté que plus de la

moitié des avortements récurrents sont dus à des causes non récurrentes [Coulam, 1991]. Les pertes au cours du premier trimestre sont généralement dues à des anomalies génétiques fœtales [Lee et Silver, 2000].

4 SYMPTOMES ET PRISE EN CHARGE DES FCS

La femme peut présenter des symptômes, comme des douleurs lombaires ou des douleurs pelviennes. Un saignement vaginal peut survenir, avec ou sans algies pelviennes. Le diagnostic est posé après un examen gynécologique, suivi d'une échographie pelvienne ou endovaginale.

- **Traitement symptomatique**

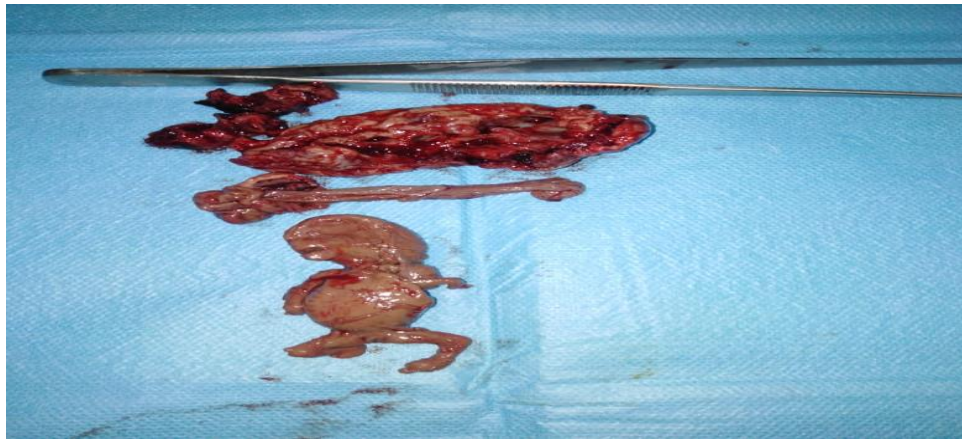
Le traitement des fausses couches varie en fonction du tableau clinique de la patiente [Nielsen et al., 1999], à la maternité de l'hôpital un dossier médical est utilisé pour faciliter la documentation. Il s'agit d'une pratique médicale de routine, cependant Il existetoujours des différences individuelles. Toutes les patientes reçoivent des informations à propos de leur état de santé, les expériences émotionnelles liées à une fausse couche sont discutées. Même des informations sur la douleur qui peut persister au cours des prochains jours sont données, avec la possibilité de mettre la patientesous un traitement analgésique. Les femmes qui ont eu des fausses couches à répétition sont invitées pour un suivi et une enquête familiale.

- **Fausse couche complète** : Une fausse couche est complète, si l'examen échographique identifie un utérus vide et que l'endomètre est à moins de 15 mm d'épaisseur. Aucun autre traitement n'est requis. Les femmes peuvent saigner pendant quelques jours [Brody et Frank, 1993; Nielsen et al., 1999].
- **Fausse couche incomplète** : est traitée si le col est ouvert et que le saignement persiste. L'examen par ultrasons révèle une épaisseur de l'endomètre supérieure à 15mm et/ou une image de rétention trophoblastique, et l'état général de la patiente est bon. La patiente est informée sur la persistance des saignements et de la douleur pendant quelques jours. Elle est encouragée à prendre un analgésique et afin de prévenir l'infection, il lui est conseillé de ne pas utiliser de tampons, ou d'avoir des rapports sexuels pendant que le saignement continue. La deuxième visite sera prévue dans les 3-7 jours et sera décidé s'il s'agit d'une fausse couche complète ou si un curetage doit être effectué [Brody et Frank, 1993; Nielsen et al., 1999].

- **Dilatation et curetage**

Une fausse couche incomplète, avec un saignement abondant ou lorsque l'état général de la patiente est altéré, un curetage d'urgence (curetage hémostatique) est effectué sous anesthésie. Les tests suivants sont effectués en préparation au geste chirurgical : une numération formule sanguine (NFS), un groupe sanguin et un bilan d'hémostase. Avant l'anesthésie, la patiente doit être à jeun pendant quatre à six heures au moins. Lorsque les formalités administratives, la préparation du dossier médical et la consultation pré-anesthésique sont terminées, l'infirmière accompagne la patiente en salle d'opération. Le médecin effectue

l'aspiration, dans le but de vider l'utérus du produit de conception avec ou sans contrôle échographique. La durée de l'opération est de cinq à dix minutes (Photographie 3).



Photographie 3 : Produit de conception macéré évacué par curetage (fœtus et placenta)

5 ETIOLOGIES DES FAUSSES COUCHES

Les fausses couches répétitives chez certains couples suggèrent que certaines femmes courent un risque particulier de perdre leurs grossesses et qu'il doit y avoir une explication à cela. Même si beaucoup de travaux ont été faits pour identifier ses mécanismes, l'étiologie des fausses couches reste inconnue dans de nombreux cas. L'étiologie d'une fausse couche est rarement définie, malgré les nombreuses avancées dans le domaine médical, la cause reste souvent peu claire [Plouffe et al, 1992; Clifford et al, 1994; Carrington et al, 2005]. Les principales causes identifiables de fausse couche comprennent :

5.1 LA PATHOLOGIE UTÉRINE

Les anomalies utérines, les polypes et les fibromes, peuvent prédisposer à une fausse couche en affectant l'implantation [Bullelli et al., 1996; Bajekal et Li, 2000].

5.2 LES ANOMALIES ENDOCRINIENNES

Après l'implantation, le maintien de la grossesse dépend d'une série d'événements endocrinologiques qui contribueront éventuellement à la croissance et au développement de l'endomètre et du fœtus [Potdar et Konje, 2005; Arredondo et Noble, 2006]. Le développement normal de l'endomètre et sa maturation dépend des hormones stéroïdes, en particulier des œstrogènes et de la progestérone. Par conséquent, une fausse couche peut être le résultat d'une anomalie au niveau de la production hormonale ou d'une réponse anormale de l'endomètre aux hormones stéroïdes circulantes [Li et al, 2002a; Arredondo et Noble, 2006].

Par ailleurs, plusieurs autres anomalies endocrinologiques maternelles telles que le diabète non équilibré [Mills et al, 1988], des niveaux élevés d'androgènes [Okon et al, 1998; Bussen et al, 1999], l'hyperprolactinémie [Tal et al, 1991], le dysfonctionnement thyroïdien [Roberts et Murphy, 2000] et l'obésité [Wang JX et al, 2002] ont été impliquées comme facteurs étiologiques des ASR.

5.3 LES INFECTIONS

Les infections génitales peuvent provoquer une fausse couche. Une infection génitale par *Chlamydia trachomatis* ou *Mycoplasma hominis* s'est révélée responsable d'un risque accru de fausse couche [Cramer

et Wise, 2000; Harrison et al, 1983]. Un risque accru d'avortement tardif a été signalé par Oakeshott chez des femmes atteintes de vaginose bactérienne [Oakeshott et al, 2002]. La vaginose bactérienne se reproduit lorsque les lactobacilles manquent et qu'une prolifération de bactéries anaérobies, y compris la *Gardnerella vaginalis* et les mycoplasmes.

Le diagnostic d'une vaginose bactérienne peut être posé en présence d'un pH élevé (> 4,5), la présence de «cellules indicatrices» et d'un «test d'odeur» positif (odeur de poisson lorsque l'hydroxyde de potassium est mélangé à l'échantillon de frottis) [Larsson et al, 2005].

Lorsque l'herpès génital primaire survient pendant la grossesse, il existe un risque accru de fausse couche [Cramer et Wise, 2000]. D'autres maladies infectieuses, telles que la rubéole, la toxoplasmose, le cytomégalovirus et la listeria ont également été signalées comme étant des causes possibles de fausse couche [Jablonowska, 2003].

5.4 LES FACTEURS IMMUNOLOGIQUES

Étant donné que le conceptus représente un produit génétique parental avec ses antigènes ; il est possible que le système immunitaire maternel le reconnaisse comme étrangers, ce qui entraîne une réponse immunitaire [Dalton et al, 1998; Hill et Choi, 2000]. La survie du fœtus semi-allogène dépend de la suppression de la réponse immunitaire maternelle et une fausse couche peut être la conséquence d'un échec de cette suppression. On suppose que les facteurs de régulation maternels et embryonnaires protègent l'embryon contre une réaction immunologique maternelle défavorable. Une adaptation maternelle à l'implantation de l'embryon est nécessaire pour la réussite de la mise en place de l'unité fœto-placentaire. L'embryon doit être capable de stimuler une réaction immunologique de la mère afin de se protéger des molécules cytotoxiques [Bulletti et al, 1996; Li et al, 2002b; Pandey et al, 2004].

Le mécanisme par lequel le fœtus échappe au rejet par le système immunitaire maternel est inconnu. Cependant, des différences dans la concentration des cellules immunocompétentes circulantes, telles que les cellules Natural killer (NK) et les cytokines ont été signalées entre les femmes ayant des ASR et les témoins [Wegmann et al, 1993; Reinhard et al, 1998; Ntrivalas et al, 2001; Yamada et al, 2001].

5.5 L'ÉTAT PROTHROMBIQUE

Un état prothrombotique peut être largement défini comme toute affection, héréditaire ou acquise, qui prédispose à une thrombose veineuse ou artérielle [Hiatt et Lentz et al., 2002]. Il est postulé que la thrombophilie maternelle est un facteur de risque de fausse couche, car une grossesse réussie dépend d'un développement placentaire satisfaisant et une fonction placentaire soutenue est basée sur la circulation placentaire [Kujovich, 2004]. Ces processus nécessitent la mise en place d'un système circulatoire foeto-maternel adéquat, qui peut être perturbé par un état prothrombotique.

Le facteur V Leiden, les mutations du gène de la prothrombine et le déficit en protéine C et en protéine S sont des troubles prothrombotiques héréditaires d'importance clinique et une association entre un risque accru de fausse couche et ces troubles a été reconnue [Preston et al, 1996; Rey et al, 2003; Kujovich,

2004]. L'un des principaux troubles prothrombotiques acquis est le syndrome des anticorps antiphospholipides (SAPL), dans lequel le corps reconnaît ses propres phospholipides comme étrangers et produit des anticorps contre eux. L'anticoagulant et l'anticorps anticardiolipine sont les deux anticorps antiphospholipides connus associés à l'ASR [Levine et al., 2002].

On ne sait pas exactement comment le syndrome des anticorps antiphospholipides (SAPL) affecte négativement la grossesse, mais une théorie est qu'il peut provoquer des caillots sanguins dans les vaisseaux du placenta altérant la fonction placentaire [Rand et al, 1997]. Cependant, le SAPL est une cause traitable de l'ASR. Divers traitements tels que l'héparine, l'aspirine et les immunoglobulines intraveineuses, ont été utilisés pour tenter d'améliorer l'issue de la grossesse des femmes atteintes du SAPL [Empson et al, 2002; Farquharson et al, 2002]. L'héparine est un agent thromboprophylactique qui peut se lier aux anticorps antiphospholipides, protégeant ainsi le trophoblaste et l'endothélium maternel des dommages vasculaires en début de grossesse. Plus tard au cours de la grossesse, lorsque la circulation intervillieuse a été établie, l'héparine contribue à diminuer le risque de thrombose placentaire et d'infarctus [Girardi, 2005, Bose et al, 2005].

5.6 LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Il a été constaté que les facteurs dans l'environnement des femmes représentent un risque accru de fausse couche, comme le tabagisme et même l'exposition des mères à la fumée ambiante du tabac (tabagisme passif). Les fumeuses ont un risque plus élevé que les non-fumeuses et ce risque est à son tour encore accru par rapport au nombre de cigarettes fumées par jour [Cramer & Wise, 2000; Mishra et al, 2000; Shiverick & Salafia, 1999]. La consommation d'alcool augmentait le risque de fausse couche [Cramer et Wise, 2000; Kesmodel et al, 2002; Windham et al., 1997]. La consommation de caféine a été décrite comme un facteur de risque faible et discutable de perte de grossesse [Cramer et Wise, 2000; Fenster et al., 1991; Leviton et Cowan, 2002].

D'autres causes étudiées donnant des résultats divergents concernant leur lien avec la fausse couche :

- La consommation de l'eau du robinet [Hertz-Picciotto et al., 1992; Waller et al., 1998] ;
- regarder des films vidéo plus de 20 heures/semaine [Schnorr et al., 1991] ;
- la station debout plus de 8 heures/jour au travail [Florack et al., 1993] ;
- et le travail avec des gaz anesthésiques [Ahmad et al., 2001; Axelsson & Rylander, 1982; Boyles et al., 2000; Cramer & Wise, 2000].

Des niveaux élevés du stress de travail sont liés à l'avortement spontané [Brandt et Nielsen, 1992; Mulder et al, 2002]. Fenster est d'avis que ce n'est pas le stress lié au travail en soi qui conduit à une fausse couche, mais plutôt la combinaison avec d'autres facteurs, par exemple une femme qui a plus de 32 ans, fume ou primipare [Fenster et al., 1995].

Neugebauer a enquêté sur le stress chez la femme enceinte, comme la mort d'un autre enfant dans la famille au cours du premier trimestre de la grossesse. Il a trouvé une corrélation, parfois même en

conjonction avec une anomalie chromosomique [Neugebauer et al, 1996]. Hansen et ses collaborateurs ont indiqué que les malformations congénitales, en particulier celles de la crête neurale (Photographie 3), peuvent être causées par un stress extrême au cours du 1^{er} trimestre, comme le décès du partenaire ou d'un enfant, une maladie nouvellement découverte, comme le cancer ou l'infarctus du myocarde [Hansen et al, 2000].



Photographie 4: Foetus malformé (Anencéphale)

Les métaux lourds, les solvants organiques et les rayonnements ionisants sont des tératogènes confirmés, et une exposition peut contribuer à la perte de grossesse [Dhont, 2003]. L'alcool et la cocaïne sont également des tératogènes confirmés, tandis que la caféine et le tabagisme sont des tératogènes présumés, mais leur impact tératogène est toujours controversé [Dominguez-Rojas et al, 1994; Parazzini et al, 1998; Cnattingius et al, 2000; Kesmodel et al, 2002].

5.7 LES CAUSES GÉNÉTIQUES

5.7.1 Les anomalies chromosomiques

En plus des causes identifiables des fausses couches décrites précédemment, les facteurs génétiques sont une cause majeure des fausses couches cliniquement reconnue. Les altérations génétiques et les instabilités chromosomiques sont associées à la perte de grossesse. La plupart des aberrations chromosomiques déséquilibrées entraînent des phénotypes sévères dès le début de la grossesse et entraînent donc une fausse couche. Par conséquent, l'incidence des anomalies chromosomiques fœtales non équilibrées diminue progressivement avec l'évolution de la grossesse à moins de 1% chez les nouveau-nés [Stern et al, 1996; Stephenson et al, 2002]. Dans l'ensemble, 50 à 70% de toutes les fausses couches sporadiques sont associées à des anomalies cytogénétiques chez le fœtus.

La plus fréquente de ces anomalies est la trisomie, suivie de la polyploidie, de la monosomie X et de la translocation déséquilibrée [Kalousek et al, 1993; Stephenson et al, 2002]. La trisomie la plus courante est la trisomie du chromosome 16, suivie de la trisomie des chromosomes 21 et 22 [Stephenson et Kutteh, 2007]. Ces anomalies chromosomiques peuvent être héritées ou de Novo dans les cellules germinales en raison d'une anomalie de formation du fuseau ovocytaire et de la division méiotique [Devine et al, 2000; Kuo, 2002].

Chez les femmes atteintes d'ASR, le taux d'anomalies chromosomiques chez le fœtus est inférieur à celui des femmes présentant une fausse couche sporadique. Les fausses couches chez les femmes atteintes d'ASR peuvent être dues à des anomalies chromosomiques numériques de Novo, en particulier les trisomies autosomiques des chromosomes 13, 14, 15, 16, 21 et 22 et la monosomie X [Pandey et al, 2005; Warren et Silver, 2008]. Cependant, la fausse couche peut également être due à des anomalies chromosomiques récurrentes chez le fœtus résultant d'une aberration équilibrée chez l'un des parents héritée par la descendance sous une forme déséquilibrée. Le dépistage cytogénétique des couples avec des ASR a révélé que des anomalies chromosomiques parentales se produisent chez l'un ou l'autre partenaire chez 5 à 7% des couples, tandis que le taux dans la population normale est d'environ 0,2% [Fryns et Buggenhout, 1998].

Les translocations équilibrées chez les deux parents, y compris les translocations réciproques et robertsoniennes, sont les anomalies les plus courantes, détectées chez environ 4% des couples atteints d'ASR. Les autres anomalies chromosomiques comprennent les inversions et les anomalies des chromosomes sexuels [Tulppala et al., 1993; Clifford et al., 1994; Fryns et Buggenhout, 1998].

Même si le risque théorique de donner une descendance anormale pour les porteurs phénotypiquement normaux de translocations équilibrées est d'environ 50%, le diagnostic préimplantatoire (DPI) a montré que le risque varie considérablement. Pour les porteurs d'une translocation équilibrée, le risque de concevoir un embryon chromosomiquement anormal, dû à une ségrégation anormale à la méiose, varie de 20 à 80%. Le risque reproductif conféré par les réarrangements chromosomiques dépend de la taille, de l'emplacement et du type de réarrangement et s'il est porté par la femme ou son partenaire [Munne et al., 2000; Otani et al., 2006; Lim C et al., 2008].

5.7.2 L'inactivation du chromosome X et ASR

L'inactivation des chromosomes X (ICX) est définie comme le processus par lequel l'un des deux chromosomes X dans chaque cellule somatique d'une femme en bonne santé est inactivé pendant l'embryogenèse précoce. L'inactivation de l'X est un mécanisme de régulation génique du chromosome X de la femme, qui permet d'égaliser dans les deux sexes l'expression des gènes liés à l'X. Elle consiste en un arrêt de la transcription des gènes d'un des deux X dans chaque cellule [Lyon, 1961; Brown et Robinson, 2000]. Les femmes sont donc des mosaïques pour deux types de cellules; les cellules avec le chromosome X paternel comme X actif et les cellules avec le chromosome X maternel comme X inactif.

Normalement, le processus se produit de manière aléatoire sur le chromosome X maternel et paternel, ce qui entraîne une distribution 50/50 des deux types de cellules. Un écart important par rapport à cette distribution est appelé ICX asymétrique [Puck et Willard, 1998; Minks et al., 2008]. Récemment, plusieurs études ont montré que les femmes souffrant d'ASR présentent plus souvent des ICX non aléatoires que les femmes témoins [Lanasa et al., 1999; Uehara et al., 2001; Kuo et al., 2008].

Kuo et al. (2008) ont rapporté une ICX extrêmement asymétrique chez 7,7% des femmes ayant des ASR et chez 1,3% des femmes témoins ($p=0,01$). L'ICX asymétrique est défini comme une inactivation

préférentielle de l'un des deux chromosomes X qui peut être le résultat d'un événement fortuit ou dû à des facteurs génétiques impliqués dans le processus d'inactivation du chromosome X [Brown et Robinson, 2000]. Dans certains cas, un modèle d'inactivation non aléatoire peut être un indicateur d'une anomalie dans le chromosome X inactivé, par exemple, les anomalies des chromosomes X telles que les microdélétions ou les mutations dans les gènes chromosomiques X [Belmont, 1996; Uehara et al, 2001]. L'écart par rapport aux taux d'inactivation aléatoires peut également conduire à l'expression de traits récessifs liés à l'X chez les femmes hétérozygotes, qui devraient être des porteuses saines du gène de la maladie [Azofeifa et al, 1995]. Il a été proposé que les mutations liées à l'X qui sont mortelles chez les hommes provoquent une ICX asymétrique chez les femmes et des maladies létales dominantes chez les hommes [Franco et Ballabio, 2006]. De telles mutations peuvent entraîner la perte de conceptus masculin et une augmentation de la fréquence des fausses couches chez les femmes porteuses [Lanasa et al, 1999; Uehara et al., 2001].

5.7.3 Les microdélétions du chromosome Y

La majorité des investigations à la recherche étiologique des ASR évalue la femme, les partenaires masculins ont cependant fait l'objet d'une enquête moins approfondie. L'analyse du sperme n'est généralement pas incluse dans l'évaluation initiale de l'ASR. Pourtant, l'intégrité des spermatozoïdes est requise pour les interactions spermatozoïdes-ovules. La qualité des spermatozoïdes, la fécondation, et le développement embryonnaire précoce, influencent la capacité de l'embryon à atteindre le stade de blastocyste et à progresser vers l'implantation [Simerly et al., 1995; Van Blerkom, 1996; Moomjy et al., 1999].

Les microdélétions du bras long du chromosome Y humain sont associées à un échec de la spermatogenèse [Vogt et al., 1996; Hopps et al., 2003]. Ces microdélétions se produisent dans des régions appelées AZFa, AZFb et AZFc (plus récemment nommées AZFa, P5/Proximal-P1, P5/Distal-P1, P4/Distal-P1, b2/b4-AZFc), contenant un certain nombre de gènes [Hopps et al, 2003; Ferlin et al., 2007]. Bien que dix délétions récurrentes dans les régions AZF aient été décrites en détails [Ferlin et al, 2007], étonnamment peu de choses sont connues sur la fonction des gènes individuels et des unités de transcription situées dans ces régions [Hopps et al., 2003; Foresta et al., 2005].

Des microdélétions du chromosome Y sont retrouvées chez environ 7% des hommes avec un très faible nombre de spermatozoïdes [Ferlin et al, 2007]. Ces hommes présentent également souvent une incidence plus élevée d'anomalies chromosomiques des spermatozoïdes [Foresta et al, 2005]. Un taux élevé de ces anomalies a également été constaté chez certains hommes de couples avec des ASR [Rubio et al, 1999; Egozcue et al., 2000]. Une étude a rapporté que l'incidence des anomalies chromosomiques du sperme est de 16,5% chez les partenaires masculins des femmes souffrant d'ASR, tandis que l'incidence est inférieure à 5% chez les témoins [Al-Hassan et al, 2005]. Une étude pilote menée pour déterminer si les microdélétions du chromosome Y sont associées à des ASR, a rapporté qu'une partie importante (82%) des partenaires

masculins des femmes avec des ASR avaient des microdélétions chromosomiques Y, ce qui peut être à l'origine des FCS vécues par leurs partenaires [Dewan et al, 2006].

5.7.4 Les mutations génétiques et polymorphismes

Les mutations et les polymorphismes de plusieurs gènes pourraient contribuer à l'ASR. Beaucoup de ces variations de séquences sont localisées dans des gènes impliqués dans des mécanismes immunologiques ou au niveau de la voie de la coagulation sanguine, mais également des gènes impliqués dans d'autres fonctions ont été associés à l'ASR. Étant donné que le conceptus présente des produits génétiques paternels et des antigènes, il est possible que le système immunitaire maternel le reconnaisse comme étranger, ce qui entraîne une réponse immunitaire [Dalton et al, 1998; Hill et Choi, 2000].

Ces dernières années, plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire ont été associés à l'avortement. Le gène CTLA-4 est un régulateur de l'activation des cellules T et un polymorphisme A/G dans l'exon 1 du gène aurait été associé à l'ASR dans la population chinoise. La fréquence du génotype GG chez les patients souffrant d'ASR était significativement plus élevée par rapport aux témoins (48,8% contre 33,3%, $p=0,011$) [Wang et al, 2005]. Des polymorphismes dans le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ont également été associés à des ASR. Un polymorphisme dans la région du promoteur HLA-G, les allèles HLA-G * 0104 et * 0105N (Aldrich et al, 2001; Ober et al, 2003) et l'allèle HLA-DRB1 * 1505 ont été associés à l'immunopathogénèse de l'ASR [Takakuwa et al, 2003].

De plus, un certain nombre de polymorphismes du gène des cytokines sont associés à une perte de grossesse. Les cytokines sont des molécules immunorégulatrices essentielles qui jouent un rôle crucial dans le développement précoce de l'embryon et de la placentation. Des associations ont été montrées entre les polymorphismes des gènes IL-6, IL-10 et IFN- γ et l'ASR [Daher et al, 2003; Costeas et al, 2004; Prigoshin et al, 2004; von Linsingen et al, 2005].

Le gène MTHFR joue un rôle important dans le métabolisme de l'homocystéine et les mutations faux-sens (missens). C677T et A1298C sont connues pour provoquer une hyperhomocystéinémie. L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque de thrombophilie vasculaire et a également été associée à l'ASR [Couto et al., 2005; Mtiraoui et al., 2006].

De plus, les polymorphismes du gène ITGB3, qui code pour un antigène plaquettaire humain, peuvent augmenter le risque de fausse couche en provoquant une thrombophilie. Il a été démontré que le polymorphisme du PLA2 dans le gène ITGB3 augmente de 3,6 fois le risque de perte fœtale [Ruzzi et al., 2005]. De plus, divers autres gènes ont été associés à une perte de grossesse. Par exemple, des mutations du gène SCO2, nécessaires à l'assemblage de la cytochrome c oxydase, ont été détectées dans un état hétérozygote chez des fœtus avortés et sont susceptibles de provoquer une fausse couche [Tay et al., 2004]. Un nouveau polymorphisme A/G dans l'intron 6 du gène eNOS, qui est actif pendant l'implantation, a récemment été associé à l'ASR [Suryanarayana et al., 2006]. Un polymorphisme dans le gène VEGF, un régulateur bien caractérisé de l'angiogenèse, a également été récemment signalé comme un nouveau facteur de susceptibilité à l'ASR. L'homozygotie de la variation VEGF -1154A était plus fréquente chez les

femmes avec des ASR par rapport aux témoins et augmentait le risque d'ASR de 2,7 fois [Coulam et Jeyendran, 2008].

5.7.5 Les anomalies de l'expression génique placentaire

La croissance et la différenciation des structures placentaires sont régulées par de nombreux gènes et le placenta est très sensible aux perturbations génétiques, comme en témoigne la liste croissante de mutations ciblées de souris dans des gènes tels que Mash2 et Hand1 qui provoquent des anomalies placentaires et une létalité embryonnaire [Rossant et Cross, 2001]. Les anomalies génétiques qui affectent le développement du placenta peuvent entraîner une insuffisance placentaire, un retard de croissance fœtale et la mort embryonnaire, tant chez la souris que chez l'Homme [Rossant et Cross, 2001; Cross, 2006]. On suppose que la placentation normale et les fonctions placentaires normales sont médiées par l'expression différentielle des gènes dans le placenta. Il a également été suggéré que les gènes exprimés dans les villosités chorales agissent comme des régulateurs critiques de la placentation et donc du développement humain précoce [Dizon-Townson et al., 2000; Baek, 2004].

Plus de 30 gènes exprimés de manière aberrante dans l'échec de la grossesse ont été identifiés. Les gènes montrant différents niveaux d'expression entre les témoins et les patients atteints d'ASR peuvent être principalement regroupés en tant que des gènes liés à l'immunité, à l'angiogenèse et à l'apoptose [Baek et al., 2002; Choi et al., 2003]. Des niveaux d'expression plus élevés de gènes liés à l'apoptose tels que la caspase 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, BAD, BAX, BID, Fas et FasL ont été révélés dans les villosités chorales des patientes souffrant d'ASR par rapport aux témoins [Choi et al., 2003].

Les gènes liés à l'immunité avec l'expression génique aberrante dans les villosités chorales comprennent PP14, MUC1 [Baek et al., 2002] et CD95 [Hoshimoto et al., 2002] et Annexin II [Aarli et al., 1997]. Ces gènes peuvent être impliqués dans des réactions immunologiques foeto-maternelles. La fibronectine, l'intégrine et le VEGF sont des exemples de gènes liés à l'angiogenèse montrant une expression génique aberrante dans le placenta des patientes souffrant d'ASR [Choi et al., 2003]. Ces gènes sont impliqués dans la formation de vaisseaux sanguins cruciaux pour le développement placentaire et embryonnaire.

5.8 LES MÉCANISMES ÉPIGÉNÉTIQUES

Le terme épigénétique fait référence aux processus qui régulent l'activité des gènes sans affecter la séquence d'ADN, ils sont héréditaires par division cellulaire. Les modifications épigénétiques de l'ADN telles que la méthylation sont importantes pour la fonction du génome pendant le développement, et les perturbations dans les processus épigénétiques hautement coordonnés contribuent aux échecs de développement [Lucifero et al., 2004; Santos et Dean, 2004]. Dans la plupart des espèces de mammifères, y compris les Humains, il existe au moins deux périodes de développement pendant lesquelles les schémas de méthylation sont reprogrammés à l'échelle du génome; le développement et la préimplantation des cellules germinales. Après la déméthylation du génome dans les cellules germinales en développement, une reméthylation qui réinitialise les marques spécifiques du parent d'origine se produit. La deuxième phase de reprogrammation de la méthylation a lieu au stade préimplantatoire.

Le génome paternel est activement déméthylé en quelques heures de fécondation chez le zygote humain, tandis que le génome maternel est déméthylé passivement par un mécanisme dépendant de la réplication après le stade d'embryon à deux cellules. Après l'étape de déméthylation, la méthylation de novo du génome se produit dans l'embryon en développement. Cette reprogrammation est susceptible d'avoir un rôle crucial dans l'établissement de la totipotence nucléaire requise pour un développement normal [Reik et al., 2001; Reik et Dean, 2001; Haaf, 2006].

L'empreinte génomique est un mécanisme qui entraîne une expression différentielle des gènes maternels et paternels. Une seule des copies héritées du gène est active dans un embryon selon l'origine parentale du gène. La méthylation de l'ADN dans les cellules germinales est essentielle pour l'impression, car la plupart des gènes imprimés ont des régions différenciellement méthylées [Reik et Dean, 2001; Swales et Spears, 2005].

L'expression anormale de gènes imprimés pendant le développement est parfois causée par une représentation déséquilibrée des contributions génétiques maternelles et paternelles. Une disomie uniparentale (DUP) est associée à un retard de développement ou à une perte de grossesse [Mutter, 1997]. On estime qu'il y a plusieurs centaines de gènes imprimés dans le génome humain. Il a été avancé que les gènes imprimés jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'apport placentaire de nutriments maternels au fœtus, en régulant la croissance du placenta et/ou l'activité du système de transport transplacentaire. Dans certains cas, les erreurs d'empreinte génomique sont mortelles pour l'embryon tandis que dans d'autres, elles entraînent des troubles et des maladies du développement [Reik et Dean, 2001; Lucifero et al., 2004; Swales et Spears, 2005].

LES DOMMAGES DE L'ADN ET ECHEC DE LA REPRODUCTION

1 INTRODUCTION

La médecine moderne et ledéveloppement industriel ont amélioré la qualité de vie dans les pays développés et ont réduit l'incidence des maladies infectieuses. Cependant, ces changements ont également exposé la population générale à une variété de substances toxiques, et les maladies liées au mode de vie causées par une inflammation excessive et le stress oxydatif sont de plus en plus répandues. En plus, des changements de style de vie, le mariage et l'accouchement à un âge tardif ont augmenté l'incidence mondiale des complications liées à la grossesse [Dietl, 2005; Iborra et al, 2005].

La grossesse est un état inflammatoire présentant une sensibilité accrue au stress oxydatif [Kontic-Vucinic et al, 2008]. Les espèces réactives d'oxygène (ROS) et d'azote (NOS) associées à l'inflammation sont connues pour causer des dommages de l'ADN. Ces derniers peuvent affecter plusieurs processus physiologiques au cours de la grossesse, depuis les premiers stades tels que la maturation des ovocytes et la qualité du sperme jusqu'aux processus de gestation tardifs impliqués dans le développement placentaire etfœtal. De plus, il a été démontré que la capacité de réparation de l'ADN est réduite chez les femmes enceintes, ce qui les rend plus sensibles aux toxines environnementales et endogènes qui peuvent être à l'origine de diverses maladies [Skoner et al., 1995].

2 LE CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire représente le processus fondamental par lequel une cellule mère donne naissance à deux cellules filles identiques entre elles, et à lacellule mère dont elles dérivent. Il est constitué essentiellement de deux temps, l'interphase au cours de laquelle les chromosomes sont répliqués, et la mitose au cours de laquelle les chromosomes se répartissent entre les deux cellules filles [Malumbres et Barbacid, 2001 ; meijer et al.,2003 ;meijer et al.,2000]. Le cycle cellulaire est classiquement divisé en quatre phases : G1, S, G2, M (chaque phase ne pouvant commencer que lorsque la précédente s'est déroulée correctement (Figure15) [Pommier et Kohn 2003 ; Stewart et al.2003].

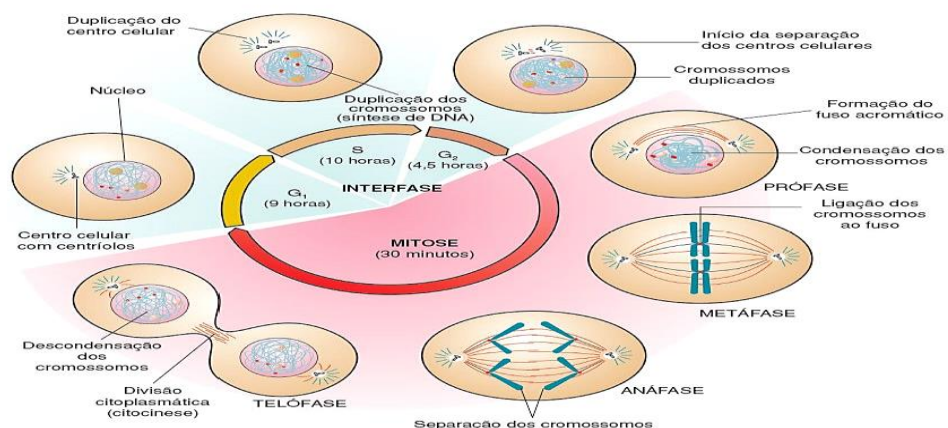


Figure 15: Schéma du cycle cellulaire [Carassou et al, 2012]

1) la phase G1 (Gap 1 ou intervalle 1) : suit la division de la cellule, la quantité d'ADN est de $2N$. Au cours de la phase G1, débutent les processus de transcription d'ARN et de synthèse protéique.

2) la phase S (Synthesis ou synthèse) : Correspond à la phase de synthèse de l'ADN. Au cours de la phase S a lieu la réplication de l'ADN aboutissant à la formation d'un brin d'ADN complémentaire identique. La quantité d'ADN double progressivement.

3) la phase G2 (Gap 2 ou intervalle 2) : Correspond à la phase de préparation de la cellule à la division cellulaire. Au cours de la phase G2 a lieu la synthèse de protéines nécessaires à la mitose et à la viabilité des deux futures cellules filles. La quantité d'ADN est de $4N$. La synthèse des ARN et des protéines débutée en phase G1, se continue en phase S et G2.

4) la phase M (Mitosis ou mitose) : Entraîne la répartition du matériel génétique entre les deux cellules filles. Elle est divisée en 5 phases : la prophase, la pro-métaphase, la métaphase, la télophase, et l'anaphase.

Une phase se trouve hors du cycle, c'est une phase de quiescence nommée G_0 , et qui représente un état de repos des cellules qui ne se divisent pas (Meijer et al., 2000).

3 LES CAUSES DES DOMMAGES DE L'ADN

L'ADN est une molécule relativement fragile qui peut être facilement endommagée in vivo par un certain nombre d'éléments différents. Il est bien connu qu'il existe un certain niveau de dommages de l'ADN même chez les individus normaux en bonne santé en raison de l'exposition aux polluants/mutagènes environnementaux ainsi qu'aux habitudes personnelles de l'individu. Chaque jour, le génome humain subit environ un million de lésions, y compris les adduits, les modifications ou la fragmentation du squelette sucre-phosphate de l'ADN [Skoner et al, 1995]. Sans réparation, les dommages de l'ADN peuvent provoquer des mutations telles que des substitutions de bases et des translocations chromosomiques qui perturbent l'expression normale des gènes ou créent des protéines anormales qui sont préjudiciables à la fonction ou à la viabilité cellulaire.

Les changements génétiques et épigénétiques qui causent des dommages de l'ADN sont déclenchés par l'exposition à des substances endogènes ou exogènes. Les dommages endogènes sont ceux causés par des agents dans la cellule elle-même (les radicaux libres du métabolisme cellulaire normal). Les dommages exogènes font référence aux dommages causés par des facteurs environnementaux. Les deux peuvent entraîner des types similaires de dommages de l'ADN et de modifications cellulaires [Kulkarni et Wilson, 2008]. L'ADN peut être endommagé directement à partir de sources exogènes telles que les rayonnements ou indirectement par des agents exogènes ou endogènes provoquant l'oxydation, l'alkylation, l'hydrolyse, la formation de produits d'addition volumineux et l'inadéquation des bases [Barzilai et Yamamoto, 2004]. Les facteurs exogènes et endogènes peuvent également dérégler les mécanismes épigénétiques, tels que la méthylation de l'ADN et la modification des histones. Ce dérèglement peut entraîner une réduction silencieuse des gènes métaboliques détoxifiants, des gènes de réparation des dommages de l'ADN et une altération de plusieurs points de contrôle du cycle cellulaire [Sawan et al, 2008; Toyota et Suzuki, 2010].

La plupart des ouvrages publiés sur la santé et la maladie se sont concentrés sur le stress oxydatif. Le mauvais choix de mode de vie tels que le tabagisme, l'excès d'alcool et la consommation de fast-food contribuent au stress oxydatif et aux maladies [Cogswell et al., 2003; Ji et al., 1997; Kim et al., 2005; Raimondi et al., 2007]. Le stress oxydatif survient lorsque la production de radicaux libres dépasse les mécanismes de défense antioxydants naturels du corps. Les radicaux libres sont instables et hautement réactifs. Ils deviennent stables en acquérant des électrons à partir d'acides nucléiques, de lipides, de protéines, de glucides ou de toute autre molécule proche provoquant une cascade de réactions en chaîne entraînant des dommages à l'ADN et/ou aux cellules.

Les deux principaux types d'espèces de radicaux libres ROS et NOS se forment de manière continue en raison de facteurs endogènes et exogènes, conduisant à des cassures simple et double brin [Burcham, 1999 ; De Bont et van Larebeke, 2004]. Un exemple de ROS, le radical hydroxyle (OH), endommage l'ADN par l'ajout de doubles liaisons et par abstraction d'un atome hydrogène (H) du groupe méthyle de la thymine et de chaque liaison C-H du 2-désoxyribose [Cooke et al., 2003]. De nombreux laboratoires ont maintenant fourni des preuves accablantes que le stress oxydatif persistant et l'excès de peroxydation lipidique sont induits par des processus inflammatoires chroniques entraînant l'accumulation de dommages massifs à l'ADN dans les organes affectés [Bartsch et Nair, 2006].

Les infections chroniques qui provoquent une réponse inflammatoire sont de puissants générateurs de peroxydation lipidique, de ROS et de NOS. L'oxyde nitrique et le superoxyde sont produits simultanément dans les macrophages et les neutrophiles. Ils induisent des bouffées d'oxygène de radical superoxyde et de peroxyde d'hydrogène qui peuvent ensuite former le puissant radical hydroxyle [Jackson et Loeb, 2001].

Les processus inflammatoires chroniques facilitent, par la dérégulation de l'homéostasie cellulaire, divers types de dommages de l'ADN, entraînant par conséquent une altération des voies de réparation de l'ADN, une surproduction de cytokines pro-inflammatoires et une réduction des taux d'apoptose des cellules endommagées [Bartsch et Nair, 2006].

Les dommages de l'ADN endogènes produisent généralement à une fréquence plus élevée que les dommages exogènes; cependant, dans les sociétés développées, les études épidémiologiques montrent que, les facteurs exogènes résultant d'expositions accidentelles ou involontaires contribuent à 75 à 80% des cas de cancer [Doll et Peto, 1981]. Aucune étude similaire n'a été réalisée en ce qui concerne la grossesse, les recherches ont montré sur des modèles animaux et des humains qu'au fur et à mesure que nous vieillissons, les taux de dommages de l'ADN augmentent [Heuser et al., 2008; Reddy Thavanati et al., 2008].

4 DOMMAGES DE L'ADN DANS LES CELLULES REPRODUCTRICES

Différents types de lésions d'ADN peuvent être observés dans toutes les cellules vivantes et les gamètes ne font pas l'exception. Pour les gamètes mâles, la présence de dommages de l'ADN dans les spermatozoïdes de l'éjaculat provient de trois mécanismes principaux :

- (i) La condensation défectueuse de la chromatine pendant la spermatogenèse, qui est liée à une protamination inappropriée et à un emballage de chromatine insuffisant [Marcon et al, 2004];
- (ii) l'incidence du processus d'avortement apoptotique, comme dans le cas des spermatozoïdes matures ; l'apoptose ne peut pas être achevée en raison de la présence du noyau et des mitochondries dans les différents compartiments [Sakkas et al, 2002]; et
- (iii) l'incidence du stress oxydatif, résultat du déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et la capacité antioxydante du système de reproduction pour compenser les effets néfastes [Agarwal et al, 2003].

Ces mécanismes peuvent être influencés par divers paramètres tels que l'âge ou la période d'abstinence, mais peuvent également être déclenchés par d'autres situations telles que l'exposition à des facteurs environnementaux stressants (produits chimiques ou radiations) ou associés à des conditions pathologiques (infections à micro-organismes, cancer, varicocèle ou hautes températures). Il est désormais bien établi que :

- La proportion des spermatozoïdes contenant de l'ADN endommagé est plus élevée chez les mâles infertiles que chez les témoins fertiles [Castilla et al, 2010] ;
- Les mâles avec une qualité de sperme réduite sont plus susceptibles de présenter un pourcentage plus élevé de spermatozoïdes contenant des molécules d'ADN endommagées que les mâles avec des paramètres de sperme normaux [Gosálvez et al, 2013];
- Et que la fécondation médiée par un spermatozoïde dont l'ADN est endommagé peut par conséquent avoir un effet négatif sur la qualité et le développement de l'embryon, la formation de blastocystes et le taux de grossesse [Simon et al, 2017].

La sensibilité de l'ovocyte aux dommages de l'ADN est moins documentée par rapport au spermatozoïde, elle peut-être dûe en partie à la difficulté d'obtenir des ovocytes à des fins de recherche. Cependant, il est accepté qu'il existe des périodes spécifiques où l'ovocyte est plus sensible aux agents externes et par conséquent, il est exposé à un risque plus élevé de dommages d'ADN. Il est particulièrement sensible aux dommages de l'ADN en périodes de division. Cela se produit au stade fœtal avant son arrêt de maturation en prophase I et à maturité lorsqu'il reprend la méiose au stade pré-ovulatoire du cycle menstruel [Zenzes et al, 2000].

Par ailleurs, les deux types de gamètes sont également sensibles aux dommages de l'ADN iatrogènes en raison de leur manipulation dans les processus thérapeutiques au cours de la procréation médicalement assistée. Les deux gamètes produisent des niveaux élevés d'espèces réactives de l'oxygène lorsqu'ils sont exposés aux lumières et aux fumées des incubateurs, tandis que les spermatozoïdes sont fortement stressés lorsqu'ils sont centrifugés [Agarwal et al, 2006]. Cette situation est particulièrement problématique, car lors des procédures de la procréation médicalement assistée, le plasma séminal et les liquides folliculaires sont récupérés, privant ainsi les cellules reproductrices d'une partie de la protection

biologique naturelle grâce aux systèmes présents dans ces biofluides tels que les systèmes neutralisant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) [Agarwal et al, 2006].

5 REPARATION DE L'ADN

Des centaines de gènes sont impliqués dans la réparation de l'ADN et il existe de grandes variations parmi les individus en ce qui concerne les polymorphismes courants qui ont un impact sur l'activité des protéines. Les nombreux types de lésions d'ADN qui résultent de facteurs endogènes et exogènes sont rapidement détectés, suite à une activation ultérieure d'un réseau complexe de voies de signalisation connues sous le nom de réponse aux dommages de l'ADN [Barzilai et Yamamoto, 2004].

L'ovocyte humain est relativement compétent pour réparer les dommages de l'ADN [Menezo et al, 2010]; cependant, le spermatozoïde mature ne l'est pas et la majorité des dommages de l'ADN embryonnaire proviendraient du gamète mâle [Barratt et al, 2010]. Malheureusement, on sait peu de choses sur la qualité de l'ADN dans les ovocytes humains, probablement en raison du manque de matériel disponible pour l'étude.

Au cours de la spermatogenèse, le sperme en cours de maturation perd progressivement sa capacité à réparer d'éventuels dommages de l'ADN [Olsen et al, 2005]. Dans l'embryon à une cellule, la réplication précise du génome est d'une importance fondamentale [Menezo et al, 2010]. Il existe trois options pour une cellule somatique ou embryonnaire qui subit des dommages de l'ADN :

- ↳ La première option est de tolérer la lésion, ce qui peut entraîner des mutations dans les cellules embryonnaires et somatiques, des anomalies de développement ultérieur et une cancérogenèse dans la prochaine génération [Menezo et al, 2010].
- ↳ La deuxième option consiste à réparer la lésion. De toute évidence, les variations de la capacité de réparation affectent le degré de dommages de l'ADN et la sensibilité aux maladies [Jaiswal et al, 2000].
- ↳ La troisième consiste à activer les voies apoptotiques. La survie cellulaire sera le résultat de l'équilibre entre les facteurs pro et anti-apoptotiques présents dans l'ovocyte.

Dans l'embryon, plusieurs centaines de milliers de processus de réparation de l'ADN sont entrepris en utilisant de multiples mécanismes de réparation des deux génomes maternel et paternel [Menezo et al, 2010]. Dans l'ovocyte et l'embryon à son début de développement, l'inversion directe des dommages (DDR) est utilisée pour réparer les produits d'addition formés par des agents de méthylation tels que les nitrosamines de tabac et les médicaments alkylants [Drablos et al, 2004] et les anomalies dans la méthylation des bases. Les ovocytes ont une activité élevée de méthylation et l'impression est le principal résultat de la méthylation, qui est un processus d'une importance extrême [Menezo et al, 2007].

La réparation simple brin (RSB) est utilisée lorsqu'un seul brin a été endommagé; cela doit être effectué rapidement afin d'éviter la création de ruptures double brin (RDB) lors de la réplication. Une fois le dommage est détecté, il est réparé par une incision puis une excision. Le brin complémentaire est utilisé

comme modèle pour accomplir la réparation. La lésion d'ADN la plus dangereuse est la RDB car elle induit une instabilité chromosomique et des échecs de réarrangements. Une seule RDB peut provoquer l'apoptose, inactiver directement des gènes clés ou conduire à de graves aberrations chromosomiques. Les RDB sont réparées par deux mécanismes, l'un basé sur la recombinaison homologue entre les molécules d'ADN sœurs, et l'autre sur la jonction rapide d'extrémité non homologue, sujette aux erreurs [Barzilai et Yamamoto, 2004].

Le dommage oxydatif de l'ADN est principalement réparé par les enzymes de réparation d'excision de base (BER) (Jaruga and Dizdaroglu, 1996). Après l'identification des dommages, les endonucléases initient la réparation, en association avec XRCC1, une protéine de réparation de l'ADN avec comme principale fonction la ligation après l'action de la polymérase. Ces composants sont tous hyper-régulés dans l'ovocyte [Menezo et al., 2010]. Il a également été montré que l'oxyde d'azote, un médiateur de l'inflammation, inhibe directement diverses enzymes de réparation de l'ADN dont celles responsables du BER. La voie de réparation par excision de nucléotides répare les volumineuses zones de dommages qui déforment la forme de l'hélice.

La réparation des mésappariements corrige les erreurs de réplication de l'ADN [Menezo et al., 2010]. Au cours d'une grossesse normale, lorsque le stress oxydatif est accru, les mécanismes antioxydants sont capables de le contrer par l'induction de l'activité enzymatique, ainsi que par des protecteurs de radicaux libres non enzymatiques. Cependant, la grossesse est un état où cette adaptation et cet équilibre sont facilement perturbés [Casanueva et Viteri, 2003].

6 LES DOMMAGES DE L'ADN ET GROSSESSE

6.1 CORRELATION ENTRE LES PARENTS ET LEUR DESCENDANCE

Une multitude d'études ont montré une corrélation significative entre la fréquence des dommages d'ADN chez les mères et leurs nouveau-nés en utilisant toutes les techniques courantes [Bocskay et al., 2005; Chen et al., 2010; Grujicic et al., 2008, 2007; Levario-Carrillo et al., 2005; Lope et al., 2010; Milosevic-Ethordevic et al., 2003; Pedersen et al., 2009; Tian et al., 2000]. Lope et al. (2010) ont inclus les pères dans leurs enquêtes et ont constaté que les dommages d'ADN (fréquence des MN dans les lymphocytes) étaient significativement corrélés entre les pères et les mères, et entre les parents et les nouveau-nés.

À la fin des années 1970 et au début des années 1980, la fréquence des MN dans les lymphocytes a été utilisée pour déterminer les effets toxicologiques de divers composés et les effets transplacentaires pendant la grossesse dans le modèle animal [Tian et al., 2000]. Des études ultérieures chez l'Homme ont montré que les médicaments prescrits au cours de la grossesse pour fournir un effet thérapeutique tel que la progestérone et les bêtamimétiques, augmentent la fréquence de MN dans le sang du cordon ombilical [Grujicic et al., 2008, 2007; Milosevic-Ethordevic et al., 2003]. Plus récemment, de nombreuses études ont indiqué que l'exposition prénatale aux polluants environnementaux est associée à des dommages d'ADN dans le sang du cordon. De plus, l'exposition à la pollution atmosphérique liée à la circulation a été associée à de nombreux effets néfastes sur la santé. L'évaluation des femmes enceintes qui vivent dans des zones

polluées a clairement démontré une augmentation de la fréquence des MN dans les lymphocytes des mères et des nouveau-nés par rapport à celles et à ceux vivants dans des environnements non pollués [Bocskay et al, 2005; Chen et al, 2010; Pedersen et al, 2009].

En outre, une publication serbe a démontré qu'après des attaques aériennes en 1999 ; provoquant une pollution environnementale considérable ; une augmentation significative de la fréquence des MNx dans le sang du cordon des nouveau-nés un an après l'événement. L'augmentation de la fréquence des MNx a été mesurée pendant 7 ans après l'attaque aérienne et avait considérablement diminué en 2006, confirmant la relation entre les dommages de l'ADN et le niveau de la pollution environnementale [Milosevic-Djordjevic et al., 2007].

6.2 L'INFERTILITE ET PERTE DE GROSSESSE PRECOCE

Environ un couple sur six souffre d'infertilité [Hull et al, 1985]. On pense que 40% des cas d'infertilité sont dus à des facteurs masculins, à savoir les spermatozoïdes anormaux, un faible nombre de spermatozoïdes, une motilité réduite et une morphologie anormale. Tandis que 40% des cas sont dus à des facteurs féminins; la cause des 20% restants est inconnue [Anderson et al, 2010]. Les anomalies chromosomiques sont les principales causes génétiques de l'infertilité et des avortements à répétition [Bobadilla-Morales et al, 2009; Nazmy, 2008]. La sélection naturelle empêche la transmission de l'ADN endommagé causant l'infertilité, mais ce mécanisme de protection peut être surmonté par des techniques de procréation médicalement assistée [Ferlin et al, 2006].

Les femmes qui ne parviennent pas à tomber enceinte après une fécondation in vitro ont des dommages d'ADN plus élevés dans le liquide folliculaire que celles qui réussissent une grossesse [Al-Saleh et al, 2010]. De plus, les dommages de l'ADN des spermatozoïdes ont été positivement corrélés à des taux de fécondation plus faibles en fécondation in vitro (FIV), à un mauvais taux d'implantation, à une incidence élevée de fausses couches et à des maladies chez la descendance, y compris le cancer [Aitken et al, 2004; Lewis et al, 2008]. Dans le sperme des hommes infertiles on trouve, des anomalies de structure de chromatine, des microdélétions des chromosomes, une aneuploïdie et des ruptures de brins de l'ADN [Aitken et De Iuliis, 2007; Barroso et al, 2000].

Les dommages oxydatifs ont longtemps été impliqués comme le principal facteur étiologique des dommages de l'ADN des spermatozoïdes. Contrairement aux cellules somatiques, le sperme est très vulnérable aux ROS en raison de leurs antioxydants et enzymes protecteurs limités [Simon et al, 2010]. Les ROS provoquent des ruptures de brins d'ADN du sperme et provoquent une perte de bases ou des modifications de bases telles que le 8-oxy-G. On a accordé moins d'attention au stress oxydatif et à l'infertilité féminine, mais la capacité de fécondation des ovocytes s'est révélée être corrélée négativement à une augmentation des dommages de l'ADN des cellules du cumulus [Raman et al, 2001].

Une étude sur des patientes référées pour une analyse chromosomique ayant eu au moins deux fausses couches spontanées ou ayant échoué à obtenir une grossesse pendant plus de 2 ans; chez qui toutes les causes connues de FCS ont été exclues ; a démontré une augmentation des dommages de l'ADN (MN

fréquence) chez les couples souffrant d'infertilité ou de FCS par rapport aux couples fertiles sans antécédents de fausse couche et qui ont un enfant de moins de 2 ans [Trkova et al., 2000]. Govindaiah et al (2009) ont démontré également que l'augmentation de la fréquence des MNx est associée à des fausses couches récurrentes.

6.3 LES DOMMAGES DE L'ADN ET COMPLICATIONS TARDIVE DE LA GROSSESSE

Des dommages de l'ADN ont été associés à des issues défavorables de la grossesse, y compris la prééclampsie (PE) et le retard de croissance intra-utérin (RCIU) [Furness et al., 2010; Potdar et al., 2009; Takagi et al., 2004]. On estime que la PE affecte jusqu'à 10% de toutes les grossesses, étant la principale cause de décès maternel dans les pays développés et un facteur majeur lié à la morbidité maternelle et périnatale [Chambers et al, 2001]. En Australie, environ 6,5% des nouveau-nés naissent avec un retard de croissance [AIHW, National Perinatal Statistics Unit, 2004], mais l'incidence varie en fonction de la population examinée et des courbes de croissance standard utilisées comme référence. Le RCIU est la deuxième cause de morbidité et de mortalité périnatale [Bernstein et al, 2000].

L'augmentation du stress oxydatif au niveau du placenta des parturientes atteintes de PE et de RCIU est bien documentée et de nombreuses études soutiennent l'idée qu'un apport sanguin inadéquat au placenta module le métabolisme maternel, l'inflammation et le stress oxydatif conduisant à des issues défavorables de grossesse [Jauniaux et al., 2006; Mandang et al., 2007; Siddiqui et al., 2010; Takagi et al., 2004]. Le stress oxydatif a également été considéré comme le principal moteur de l'apoptose placentaire provoquant la libération de débris placentaires dans la circulation maternelle, le processus pathogène clé dans la progression de la PE (Bainbridge et al, 2006). Ces changements dans les marqueurs circulants des ROS précèdent le développement des symptômes cliniques de cette pathologie [Jauniaux et al, 2006]. Il existe une abondance de la littérature concernant le lien entre la PE et les ROS ainsi que les issues de grossesse défavorables, mais la mesure des ROS in vivo est un peu controversée. La sensibilité et la spécificité de divers marqueurs de stress oxydatif ne sont pas connues.

La mesure des biomarqueurs de ROS est sujette à des variations inter-laboratoires et à des différences inter-observateurs. Une méthode plus robuste et plus fiable telle que le test des micronoyaux est nécessaire pour déterminer la relation entre les dommages de l'ADN et les issues de grossesse indésirables à savoir les fausses couches. Seule une étude a utilisé cette technique validée, indiquant que la fréquence des micronoyaux est augmentée chez les femmes enceintes de 20 semaine d'aménorrhée (SA) avant tout symptôme clinique, développant ensuite une PE et un RCIU [Furness et al, 2010].

7 MESURE DES DOMMAGES DE L'ADN

La surveillance des dommages de l'ADN est le plus souvent utilisée pour évaluer l'exposition de la population aux polluants environnementaux (mutagènes). La mesure de ces dommages est importante pendant la grossesse, car le fœtus est exposé à une variété d'agents environnementaux et de médicaments qui traversent le placenta. Les dommages de l'ADN ont été bien étudiés et plusieurs classes ont été identifiées telles que la perte de chromosomes, les cassures d'ADN simple et double brin, la fragmentation

d'ADN et l'oxydation de base. C'est le domaine de la toxicologie génétique ou génotoxicologie qui est une discipline qui vise à détecter des facteurs chimiques ou physiques interagissant (directement ou non) avec l'ADN des cellules somatiques et/ou germinales, et qui en l'absence de réparation fidèle, sont susceptibles de provoquer des mutations géniques et/ou chromosomiques. Ces mutations géniques et chromosomiques sont susceptibles d'initier un processus cancérogène lorsqu'elles ont lieu sur des cellules somatiques. En cas d'atteinte des cellules germinales, l'effet génotoxique risque d'entraîner une toxicité vis-à-vis de la reproduction (reprotoxicité) et/ou un risque théorique de transmission des mutations à la descendance [Thybaud et al, 2007 ; Meek et al, 2003].

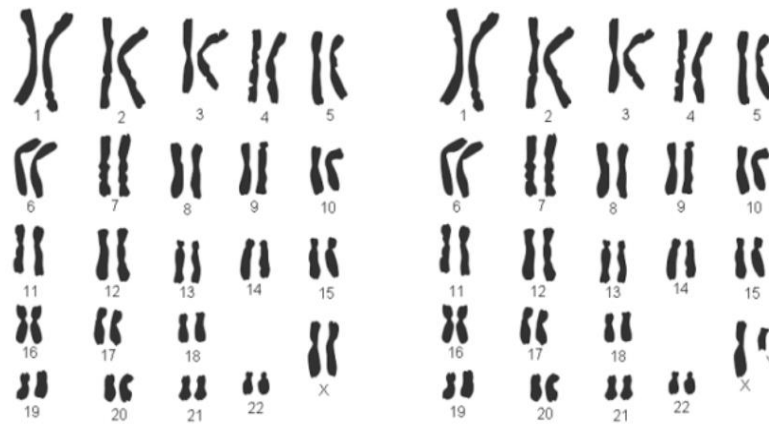
Les objectifs des différents tests de génotoxicité sont d'une part d'identifier les agents génotoxiques, mais également de déterminer leurs modes d'action moléculaires et cellulaires (bio-activation, nature des interactions avec l'ADN, modifications de bases, cassures de brins, pontages, intercalations, substitutions, addition ou délétion de paires de bases, cassures chromatidiennes ou chromosomiques, ou pertes de chromosomes entiers, . . .) [Dearfield et al, 2005]. Différents tests de génotoxicité ont été développés pour évaluer le risque de survenue des trois types de dommages génétiques responsables de pathologies humaines : les mutations géniques (modifications d'une ou de quelques paires de base dans un seul gène), les mutations chromosomiques de structure (translocations et inversions consécutives à des cassures double-brins directes ou indirectes) et les mutations aneugènes (qui induisent une perte de chromosomes entier) [Dearfield et al, 2002].

Les lésions primaires de l'ADN peuvent être évaluées par le test des comètes ou par la détection de différents types d'adduits ; les mutations géniques par le test d'Ames ou le « Mouse lymphoma assay », les lésions chromosomiques clastogènes et aneugènes par le test de micronoyaux ou le test des aberrations chromosomiques [Morita et al, 2009]. Ce dernier permet de mettre en évidence la présence d'anomalies chromosomiques de nombre ou de structure, consécutives à l'action d'agents génotoxiques. Les micronoyaux se définissent comme des entités nucléaires indépendantes du noyau principal et présentes dans le cytoplasme des cellules en interphase. Ils sont constitués de fragments de chromosomes (effet clastogène) ou de chromosomes entiers (effet aneugène) perdus par le noyau cellulaire au cours de la mitose [Kirsch-Volders et al, 2011 ; Samanta et al, 2004].

7.1 Caryotype

Historiquement le caryotype est le premier examen permettant une analyse du génome qui a permis d'identifier des anomalies chromosomiques. Il permet d'identifier plusieurs types d'anomalies chromosomiques. Afin de mieux les appréhender, il faut rappeler que depuis les travaux de Tjio et Levan en 1956, il a été démontré que l'espèce humaine comporte 46 chromosomes (Figure 16) : 22 paires d'autosomes, soit 44 autosomes et une paire de gonosomes (chromosomes sexuels), soit deux gonosomes. Les femmes ont deux chromosomes X et les hommes ont un chromosome X et un chromosome Y [Harper et al, 2006]. En 1959, dans le service du professeur Turpin, Gauthier et Lejeune ont identifié la première anomalie chromosomique chez des patients présentant un phénotype du syndrome de Down. Ces patients

n'avaient pas 46 chromosomes mais 47 chromosomes. Le chromosome supplémentaire est un chromosome 21 portant donc à trois le nombre de chromosomes 21, d'où le terme de trisomie 21.



Caryotypes d'un individu de l'espèce humaine de sexe féminin (à gauche) et de sexe masculin (à droite)

Figure 16: Caryotype d'un individu de l'espèce humaine de sexe féminin (à gauche) et du sexe masculin (à droite)

La réalisation d'un caryotype est basée sur la culture cellulaire avec un blocage du cycle cellulaire au stade métaphase de la mitose. Durant cette phase les chromosomes sont condensés permettant une analyse de leur nombre et de leur structure. Le tissu le plus souvent utilisé pour faire un caryotype est le sang (lymphocytes), mais d'autres tissus comme la peau (fibroblastes), la moelle (étude des hémopathies) ou encore d'autres types cellulaires comme les cellules trophoblastiques ou les amniocytes (en cas de caryotype foetal) peuvent être utilisés. La culture cellulaire commence par le prélèvement stérile d'un tissu dont les cellules pourront se diviser. Ces cellules isolées seront cultivées dans un milieu favorable à leur division, enrichies en substances stimulatrices comme la phytohématagglutinine, substance permettant un pic de mitoses après 72 heures de culture.

Pour obtenir un maximum de cellules en métaphase, la colchicine sera ajoutée pour bloquer le fuseau mitotique en métaphase. Une solution hypotonique est ensuite utilisée pour détruire la membrane cellulaire et extraire les chromosomes. Les chromosomes ainsi obtenus seront fixés par une solution d'éthanol et d'acide acétique pour leur permettre de garder leur aspect condensé. Un culot chromosomique sera ainsi obtenu contenant les chromosomes de nombreuses cellules humaines. Une goutte de ce culot pourra être étalée sur une lame. Pour pouvoir différencier les 46 chromosomes après leur étalement sur lame, des techniques de dénaturation sont nécessaires. Ces techniques qu'on appelle aussi « techniques de banding chromosomique », consistent à dénaturer (détruire) la charpente protéique des chromosomes. Deux types de techniques de dénaturation sont le plus souvent utilisées : la dénaturation en bandes R obtenues par la dénaturation thermique et la technique en bandes G obtenues après une dénaturation enzymatique par la trypsine. La dénaturation chromosomique est suivie par une ultime étape de coloration par le Giemsa. Cette coloration permet de révéler une alternance de bandes claires et de bandes sombres témoignant de la dénaturation différentielle qu'a subit le chromosome.

Le caryotype permet d'identifier différents types d'anomalies, la principale limite du caryotype est son niveau de résolution qui ne dépasse pas 5 à 10 millions de paires de bases (Mb). Ainsi, les années 1990 ont

été marquées par l'apparition de la cytogénétique moléculaire qui combine des techniques de génétique chromosomique et de génétique moléculaire et permet d'identifier des anomalies chromosomiques de plus petite taille.

Le caryotype présente une très bonne sensibilité en ce qui concerne le dépistage des trisomies autosomiques (13, 18 et 21) et des aneuploïdies affectant les chromosomes sexuels, lesquelles représentent la plupart des assortiments chromosomiques fœtaux anormaux [Rickman et al., 2006]. De plus, le caryotype complet présente l'avantage de permettre le dépistage d'autres aberrations chromosomiques, tant numériques que structurales (délétions, translocations, inversions et insertions), selon une résolution d'environ 10 millions de paires de bases (10 Mb) d'ADN.

Le caryotype présente néanmoins un certain nombre de limites [Schaeffer et al., 2004], en raison du temps requis pour la collecte et la mise en culture des cellules, ainsi que du processus d'analyse exigeant une main-d'œuvre avec l'exécution d'un caryotype complet qui nécessite environ de 7 à 14 jours. Des efforts considérables ont donc été déployés pour élaborer de solides techniques de biologie moléculaire qui ne nécessitent pas une mise en culture avant l'analyse et se prêtent à l'automatisation, permettant ainsi l'obtention de résultats plus rapidement et à moindre coût.

7.2 TEST DES MICRONOYAUX (MNx)

Le test des micronoyaux (the Cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN Cyt)) est l'une des méthodes les plus utilisées pour évaluer les dommages et la réparation de l'ADN. Des études ont montré que le test des Micronoyaux est une méthode robuste, sensible et reproductible de mesure des dommages de l'ADN dans les lymphocytes du sang périphérique et du cordon ombilical [Furness et al., 2010; Govindaiah et al., 2009; Mateuca et al., 2006; Trkova et al., 2000].

Les micronoyaux (MN), également connus sous le nom de corps de Howell-Jolly, ont été identifiés pour la première fois à la fin du XIXe siècle dans des précurseurs de globules rouges par William Howell, un américain, et Justin Jolly, un français [Sears et Udden, 2011]. À cette époque, les corps de Howell-Jolly étaient décrits comme des restes de noyaux de globules rouges circulant dans des organes présentant des caractéristiques pathologiques [Sears et Udden, 2011]. L'importance des MNx a été évaluée au milieu du XX^{ème} siècle. Dawson et Bury, (1961) ont trouvé des MNx dans les globules rouges de la moelle osseuse au cours des différents états pathologiques [Dawson et Bury, 1961].

Les auteurs ont également mentionné que la formation des corps de Howell-Jolly était associée à une carence en acide folique et en vitamine B. Peu de temps après, le MN a été décrit dans d'autres cellules, principalement les lymphocytes. L'irradiation des lymphocytes in vitro a provoqué une relation linéaire entre la dose délivrée et l'induction de micronoyaux. Dans la même étude, la technique du test micronoyau a été proposée comme méthode fiable pour mesurer les dommages chromosomiques causés par des agents cytotoxiques in vivo [Fenech et Morley, 1985].

7.2.1 Formation des micronoyaux

Les micronoyaux sont de minuscules corps extra-nucléaires provenant de fragments de chromatides/chromosomes acentriques ou de chromatides/chromosomes entiers qui sont en retard à l'anaphase des cellules en division et ne sont pas inclus dans le noyau principal pendant la télophase. Au lieu de cela, ils sont enveloppés par la membrane nucléaire et ressemblent à la structure du noyau de la cellule fille, bien qu'ils soient de plus petite taille [Sedelnikova et al., 2007; Fenech et al., 2011]. Les micronoyaux sont formés de chromatides ou de chromosomes entiers en raison d'un défaut dans la ségrégation des chromosomes pendant l'anaphase généralement causé par une défaillance du fuseau mitotique, des dommages aux kinétochores, une hypométhylation de l'ADN centromérique et des défauts dans le système de contrôle du cycle cellulaire [Mateuca et al, 2006] (Figure 17).

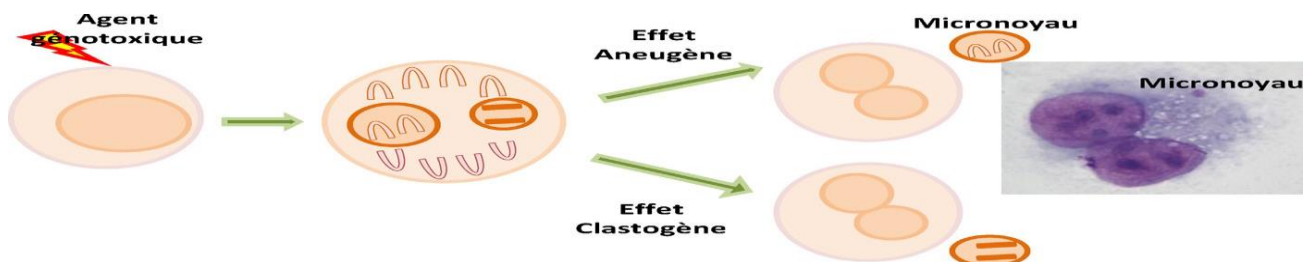


Figure 17: Principe du test des Micronoyaux sur les cellules somatiques [Mateuca et al, 2006]

7.2.2 Sort des cellules à micronoyaux

L'analyse du sort des MNx dans les cellules, a regagné beaucoup d'intérêt. Une étude a suggéré que le MN formé après la mitose était maintenu de manière stable dans les cellules pendant un cycle cellulaire maximum. De plus, la division mitotique des cellules avec des MN a conduit à la formation de cellules filles avec ou sans MN [Utani et al, 2010]. La capacité de l'ADN des MN à se répliquer reste obscure, mais certaines suggestions ont été faites selon lesquelles la réplication de MN dépend de sa nature, et si cela se produit, elle se produit généralement en même temps que la réplication du noyau principal [Obe et al., 1975]. Les événements de transcription du MN dépendent principalement de sa structure, le MN contenant des chromosomes entiers a montré une transcription active [Labidi et al, 1987]. La formation de micronoyaux chez l'Homme est associée à diverses conditions médicales ; le MN dans les spermatozoïdes peut conduire à l'infertilité, tandis qu'un nombre élevé de MN dans les lymphocytes est associé à des complications de grossesse et à des fausses couches [Fenech, 2011].

7.2.3 Fréquence de formation des micronoyaux

Différentes variantes peuvent moduler l'effet des agents génotoxiques sur la fréquence des MNx. Ce sont principalement les facteurs de l'hôte (âge, sexe), le mode de vie (tabagisme, alcool, occupation, apport en folates et vitamines) et la sensibilité aux maladies (cancer) [Iarmarcovai et al., 2008]. Bolognesi et al, (1997) ont décrit une augmentation liée à l'âge des dommages des chromosomes et de formation de MNx dans les lymphocytes. La fréquence de base des MNx chez les nouveau-nés et les enfants est relativement faible, mais une plus grande sensibilité aux dommages de l'ADN chez les enfants peut rapidement augmenter la formation des MN en raison de l'exposition environnementale aux agents génotoxiques [Holland et al.,

2011]. Les facteurs liés au sexe ont été étudiés parallèlement au vieillissement, une fréquence plus élevée des MN a été signalée chez les femmes [Barale et al., 1998].

7.2.4 Micronoyaux et complications de la grossesse

Il existe de nombreux mécanismes génétiques possibles qui peuvent conduire à l'infertilité et à un ensemble de complications, telles que la perte de grossesse (avortement précoce, avortement tardif, MFIU, décès périnatal), le retard de croissance intra-utérin (RCIU), le développement foetal anormal et la pré-éclampsie. Ces effets peuvent également être dus à une placentation défectueuse. Pour toutes ces conditions, il est plausible que l'augmentation des dommages de l'ADN puisse diminuer la viabilité de l'embryon et du placenta qui soutient l'embryon. Une augmentation de la fréquence des MNx dans les lymphocytes mesurée à l'aide du test des micronoyaux (CBMN) est associée à un risque accru de ces complications.

Trkova et al, (2000) ont testé l'hypothèse selon laquelle les couples infertiles ont une fréquence plus élevée de dommages chromosomiques dans leurs lymphocytes en mesurant les MNx dans les lymphocytes des couples présentant une infertilité idiopathique ainsi que des couples ayant deux ou plusieurs avortements spontanés et les ont comparé à des couples fertiles ayant une grossesse normale. Ils ont trouvé une fréquence significativement plus élevée des MNx chez les couples infertiles et ceux avec des avortements spontanés par rapport aux témoins à la fois, lorsque les données de chaque membre du couple ont été analysées séparément et lorsque la fréquence des MNx du couple a été combinée. La cause de l'échec de la reproduction dans ces cas est inconnue; cependant, l'un ou l'autre partenaire peut contribuer à des anomalies génétiques qui peuvent provoquer l'infertilité ou un avortement spontané.

Les micronoyaux dans les lymphocytes ont également montré une corrélation positive avec l'homocystéine plasmatique et l'allèle MTHFR 677T, impliquant le rôle de la carence en folate et en vitamine B12 comme un facteur causal. Les sujets avec des avortements spontanés à répétition (ASR) ont montré une fréquence de MN significativement plus élevée que les témoins respectifs, indiquant que les dommages de l'ADN dans les deux sexes sont des facteurs de risque pour les ASR [Trkova et al., 2000]. Deux études antérieures avaient montré que les dommages chromosomiques, tels qu'évalués par la fréquence des MNx, étaient augmentés chez les couples infertiles et chez ceux qui avaient connu des fausses couches récurrentes par rapport aux couples fertiles [Trkova et al, 2000; Govindaiah et al., 2008].

7.3 TEST DES ECHANGES ENTRE LES CHROMATIDES SŒURS

Les échanges entre les chromatides sœurs (ECS) sont des échanges réciproques de produits de réplication de l'ADN sur des sites homologues entre deux bras de chromatides au sein d'un même chromosome dans des cellules en division [Decordier et Kirsch, 2006]. Ces échanges se produisent spontanément dans toutes les cellules à un faible degré, et le taux de leur formation augmente lorsque l'ADN est endommagé et/ou mal réparé. Le test des ECS est utilisé pour établir les effets génotoxiques des agents physiques et chimiques. Les ECS ont pu être détectés après l'incorporation de la bromodésoxyuridine (BrdU) dans l'ADN chromosomique pendant deux cycles cellulaires.

L'ECS est reconnu dès le moment où Taylor (1957) a découvert un échange inattendu d'ADN marqué entre les chromatides sœurs. Les mutations survenant soit de manière héréditaire, soit en raison des facteurs environnementaux comme les rayonnements à haute énergie, certains produits chimiques et virus, provoquant des perturbations dans les schémas morphologiques normaux de la mitose. Les différents agents génotoxiques sont capables de provoquer des coupures dans les brins d'ADN, et la coupure dans un seul brin d'ADN libère l'extrémité coupée, qui envahit ensuite l'hélice complémentaire exposée pour créer une courte région d'appariement. Cela déclenche un événement général de recombinaison et une dénaturation de l'ADN.

Les agents de coupure d'ADN induisent des échanges réparateurs entre les chromatides sœurs pendant le cycle cellulaire. Par conséquent, cela provoque un échange ou un croisement de matériel génétique entre les deux chromatides d'un chromosome pendant la mitose. Ainsi, l'ECS est un mécanisme pour sauvegarder et réparer l'ADN endommagé [Jeyapradha et al, 2011]. Normalement, cinq à huit ECS par cellule sont présents, mais cela augmente considérablement chez les patients atteints d'anomalies héréditaires comme le syndrome de Bloom, Xeroderma pigmentosum, l'anémie de Fanconi ainsi que les tumeurs malignes et les tumeurs précancéreuses [Jeyapradha et al., 2011].

7.4 TEST TERMINAL DE MARQUAGE DE DUTP-NICK END

Induit par la désoxynucléotidyl transférase ou «TUNEL» est une méthode directe pour l'évaluation de la fragmentation de l'ADN, en quantifiant le dUTP incorporé à des cassures d'ADN double brin catalysées par la désoxynucléotidyl transférase terminale. Ce test est fréquemment utilisé pour évaluer les dommages de l'ADN dans le sperme. Les dommages de l'ADN du sperme mesurés à l'aide du test TUNEL ont été associés à l'infertilité et à la perte de grossesse [Lewis et al, 2008].

7.5 TEST COMET

Le test d'électrophorèse sur gel monocellulaire (SCGS), également connu sous le nom de test Comet, est une autre technique populaire pour détecter les dommages de l'ADN. Le test Comet est basé sur le principe selon lequel l'électrophorèse provoque la migration des fragments d'ADN et des cassures des brins du noyau d'ADN central, révélant une queue d'ADN traînante, c'est-à-dire une «comète». Il a également été utilisé pour démontrer une augmentation des dommages de l'ADN dans les complications liées à la grossesse [Babazadehet al., 2010; Raman et al., 2001; Simon et al., 2010; Wu et al., 2007].

Le test Comet est hautement reproductible avec une plus grande sensibilité que le test TUNEL, même sans décondensation préalable de la chromatine (Irvine et al., 2000; Leroy et al., 1996). Le test Comet peut détecter des dommages équivalents à seulement 50 ruptures simple brin par cellule et a une utilisation plus large dans la détection des ruptures par rapport au test TUNEL. L'inconvénient de ce test est qu'il nécessite des chercheurs qualifiés pour le pratiquer d'une manière optimale et les résultats peuvent varier d'un laboratoire à l'autre. Par conséquent, le test Comet bénéficierait de protocole standardisé [Barroso et al., 2009].

ETUDE CYTOGENETIQUE ET AVORTEMENTS SPONTANES A REPETITION

1 INTRODUCTION

L'identification de la cause génétique des avortements spontanés est nécessairement effectuée comme un travail clinique de routine, car la plupart d'entre eux sont incurables et inévitables en raison de leur caractère sporadique. Il est fortement recommandé d'identifier le caryotype et d'établir la cause dans le cas d'ASR [Stephenson et al, 2002]. Ainsi, lorsqu'une anomalie du caryotype est la cause d'un avortement chez les patients atteints d'ASR, il est possible d'éviter des tests ou des traitements inutiles [Stephenson et al, 2002]. Les résultats des caryotypes anormaux auraient un meilleur pronostic pour les grossesses futures [Ogasawara et al, 2004]. D'autres investigations seront nécessaires, ainsi qu'un changement de protocole thérapeutique en cas d'avortement à caryotype normal.

La détection d'une anomalie de structure déséquilibrée dans un produit d'avortement, exige la détermination du statut du porteur chez les parents pour offrir des informations précises sur la possibilité d'avoir un autre avortement ou une descendance anormale. Le diagnostic génétique préimplantatoire (DPI) trouve tout son intérêt devrait pour les couples porteurs d'anomalies chromosomiques [ESHRE, 2008].

2 LES ANOMALIES GENETIQUES DES COUPLES ET AVORTEMENTS SPONTANES PRECOCS

Les anomalies et les instabilités génétiques sont associées aux pertes de grossesses. Les chromosomes portent l'information génétique des parents et le fœtus en hérite la moitié de la mère et l'autre moitié du père. Des erreurs dans la transmission et la division des chromosomes entraînent souvent une expulsion précoce du conceptus. Les anomalies génétiques des parents contribuent à 4% des avortements. Les deux tiers des pertes des grossesses du premier trimestre sont dues à des anomalies chromosomiques du conceptus, ce qui est plus courant avec l'avancement en âge maternel. S'il y a des antécédents familiaux d'avortements spontanés récurrents, les risques d'avoir une anomalie chromosomique chez ces personnes sont plus importants. L'instabilité due à diverses altérations de structure de l'ADN et des chromosomes, si elle est trouvée à des niveaux plus élevés que prévus conduit à des pertes répétées des grossesses.

2.1 L'INCIDENCE DES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES CHEZ LES COUPLES SOUFFRANT D'ASPR

L'incidence des anomalies chromosomiques s'est avérée plus élevée chez les couples souffrant d'ASPR que dans la population générale, elle est comprise entre 5,34% et 6,36% [Fryns & Van Buggeabout (1998)]. Parmi les anomalies détectées, la fréquence des translocations réciproques équilibrées était la plus élevée (56,6% à 66,7%) et la fréquence des translocations robertsoniennes était de 9,7% à 28,3%. Les autres anomalies de structure observées étaient des inversions péri et paracentriques des autosomes et des chromosomes sexuels (Tableau 2).

Tableau2: Incidence des anomalies chromosomiques des couples souffrant d'ASPR

Auteurs	Nombre de cas	Cas avec anomalie chromosomique	Pourcentage
Rowley et al. (1963)	30	1	3,3%
Wingate (1965)	22	5	22,7%
McKay et al.(1967)	40	2	5,0%
Shaw (1967)	60	1	1,6%
Bishun et al. (1968)	27	3	11,1%
Pergament (1968)	82	6	7,3%
Stenchever et al. (1968)	46	1	1,3%
Kadotani et al. (1969)	142	8	5,6%
Wilson et al. (1969)	100	10	10,0%
Stenchever et al. (1971)	62	3	4,8%
Mameti M et al. (1984)	50	4	8%
Campana M et al. (1986)	5445		5%
Celep F et al. (2006)	1290	25	3,86%

Dans une autre étude, 50% des avortements spontanés au premier trimestre étaient dus à des anomalies chromosomiques du fœtus. Les anomalies de nombre étaient prédominantes, suivies des anomalies de structure et du mosaïcisme chromosomique. Alors que chez leurs parents, le taux des anomalies chromosomiques de structure se situait entre 4-6% [Goddijn et Leschot, 2000]. Les femmes porteuses d'anomalies de structure étaient plus que les hommes, le type le plus fréquent était les translocations réciproques (63,4%), les autres anomalies étaient des inversions - péricentrique (12,2%), paracentrique (9,8%) et les translocations de type robertsonien (7,3%). Alors que les translocations impliquant le chromosome «Y» et le chromosome marqueur étaient respectivement de 4,9% (Y; 22) et (2,4%) [Goddijn et al. 2004].

2.2 LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DES COUPLES SOUFFRANT D'ASPR ET LE NOMBRE D'ASP

Une méta-analyse sur 22199 couples (44398 individus) ayant des ASR a montré principalement des translocations ou des inversions; les translocations étaient de type réciproque ou robertsonien. Les individus ayant des antécédents de plus de deux avortements, avaient davantage d'anomalies chromosomiques telles que les translocations réciproques en comparaison aux autres (Tableau 3). En ce qui concerne la distribution des anomalies chromosomiques entre les hommes et les femmes, elles étaient plus importantes chez les femmes par rapport aux hommes [De Braekeleer & Dao, 1990] (Tableau 4).

La fréquence des anomalies chromosomiques de structure chez les couples ayant deux avortements spontanés ou plus, était de 3 à 6% par rapport aux témoins (0,3 à 0,5%) [Tharapel et al., 1985; Bourrouillou et al., 1986; Goddijn et Leschot, 2000; Yamada et al., 2001].

Tableau3: Répartition des anomalies chromosomiques en fonction du nombre d'AS

Avortements spontanés (AS)	1	2	≥ 3
Total No. of Individuals	4224	23416	5680
Reciprocal translocations	21 (0.5)	323 (1.38)	86 (1.5 1)
Robertsonian translocations	15 (0.36)	145 (0.62)	38 (0.66)
Inversions	6 (0.14)	47 (0.2)	12 (0.21)
Sexchromosome aneuploidy	3 (0.07)	15 (0.06)	8 (0.14%)
Supernumerary chromosome	4 (0.09)	6 (0.03)	1 (0.02)

Tableau4: Répartition des anomalies chromosomiques selon le sexe du porteur

	Homme	Femme	Total
Total No. Individus	16 661	16 661	33 322
Translocation Réciproque	150 (36.1)	265 (63.9)	415
TranslocationRobertsonienne	58 (30.4)	133 (69.6)	191
Inversions	25 (41.7)	35 (58.3)	60
Chromosome sexuel	7 (26.9)	19 (73.1)	26
Aneuploidy			
Chromosome surnuméraire	2 (18.2)	9 (81.8)	11

Source (tableau 3 et4) : De Braekeler et Dao, 1990

Le taux des anomalies chromosomiques était plus élevé (2,8%) chez les couples ayant plus de trois avortements par rapport à ceux ayant deux avortements consécutifs (1,1%) et les anomalies étaient des translocations et des inversions [Fitz Simmons et al, 1983]. L'étude comprenait 740 personnes, dont 351 couples et 38 personnes, réparties en trois groupes en fonction du nombre des avortements et 40 personnes ont été éliminées par manque de données :

Groupe I - deux pertes de grossesse consécutives ;

Groupe II - trois pertes de grossesse consécutives ou plus ;

Groupe III – les individus qui ont plus de 50% de perte fœtale, ils ont au moins deux pertes de grossesse qui peuvent être non consecutives, et inclus également les pertes fœtalesdu 3^{ème} trimestre. Les décès néonataux ne sont pas inclus.

a montré ce qui suit (FitzSimmons et al, 1983)

Dans le groupe I : comprenant 165 couples et 10 femmes, les anomalies chromosomiques ont été observées dans 1,8% des cas (trois translocations, deux inversions péricentriques du chromosome 9, et un mosaïcisme de chromosomes sexuels).

Dansle groupe II :144 couples et 17 femmes, les anomalies chromosomiques ont été trouvées chez 2,3% (7 personnes) avec cinq translocations et une inversion et un mosaïcisme de chromosomes sexuels.

Dans le groupe III :55 individus (26 couples et 03 femmes), uneseule inversion péricentrique du chromosome 13 a été observée (1,8%).

Les anomalies des chromosomes sexuels qui représentaient environ 0,2% de la population étaient généralement associées à des pertes de grossesse [Subit, 1980; Lubs et a1, 1979]. La non-disjonction

méiotique chez ces individus est susceptible d'être à l'origine du risque de trisomie dans le conceptus conduisant à des avortements récurrents. Les translocations réciproques et robertsoniennes équilibrées sont considérées comme la cause la plus fréquente des avortements récurrents et le mécanisme de celle-ci a été de nouveau attribué à la ségrégation dans la méiose résultant des gamètes déséquilibrés. Les translocations en général ont été estimées à 0,08% de la population [Lubs et al, 1979] et 0,88% et 1,6% dans les groupes 1 et 2 respectivement [FitzSimmons et al, 1983].

2.3 LES TRANSLOCATIONS CHROMOSOMIQUES DES COUPLES SOUFFRANT D'ASPR

L'anomalie chromosomique parentale la plus courante contribuant à l'avortement est la translocation qui se produit lorsqu'une partie du (des) chromosome(s) se casse et les fragments se rejoignent. Dans les translocations, il n'y a pas de perte du matériel génétique. Cependant, les points de cassure peuvent provoquer la perturbation d'un gène critique ou juxtaposer des morceaux de deux gènes pour créer un gène-oncogène par fusion. Ces translocations se produisent lors de la méiose et entraînent des perturbations de la fertilité ou de la conception (avortement). Par conséquent, la plupart des porteurs de translocations équilibrées sont phénotypiquement normaux; tandis qu'au niveau de la constitution des gamètes, ils sont anormaux. L'incidence des porteurs de translocation chez les couples victimes d'avortements récurrents s'est avérée être de 7,1% dans une étude où tous les porteurs de translocation étaient des femmes [Soh et al., 1984].

Dans une étude portant sur 1142 couples souffrant d'ASR, 55 réarrangements chromosomiques majeurs (4,81%) et 40 variants chromosomiques (3,5%) ont été observés. Les principales anomalies chromosomiques étaient des translocations réciproques et robertsoniennes avec des inversions [Portnoi et al, 1988]. Parmi les translocations, les translocations réciproques étaient le groupe le plus important impliquant la plupart des autosomes sauf 9, 21, X et Y. Les translocations robertsoniennes dans neuf cas étaient confinées aux chromosomes 13 et 14. Concernant les inversions, les péricentriques étaient plus que les paracentriques. De plus, une rare entité de translocation réciproque t(10; 12q) avec une translocation robertsonienne t(13q: 14q) a également été signalée chez une femme [Portnoi et al, 1988]. Tout en corrélant les réarrangements chromosomiques majeurs avec les antécédents obstétricaux, il a été observé que pour les couples n'ayant que des avortements récurrents, la fréquence était de 4,02.

Il n'y a pas eu d'augmentation de l'incidence des anomalies chromosomiques avec le nombre d'avortements. Au contraire, une baisse (3%) a été observée chez les patients qui avaient des antécédents de plus de 3 avortements. Chez les couples ayant des antécédents d'avortement, de morts nés suivie d'un enfant mal formé, la fréquence était de 4,39 ; tandis que dans le groupe avec des antécédents d'avortements et d'un enfant normal, la fréquence des anomalies du caryotype étaient de 6,64%.

Les variants chromosomiques, les blocs hétérochromatiques constitutifs paracentromériques (1qh & 9qh) et l'inversion péricentrique du chromosome 9 étaient les plus fréquents.

➤ Les différents types de translocations

❖ Les translocations réciproques

Sont des translocations dans lesquelles l'échange (mutuel) est entre les segments terminaux des bras de deux chromosomes. La prévalence de ce type de translocations est de un sur mille (1/1000). Les chromosomes 9, 10, 11, 13, 18, 21 et 22 se sont révélés les plus fréquemment impliqués dans les translocations réciproques [Cohen et al, 1996]. De Braekeleer et Dao (1990) ont suggéré que les translocations réciproques équilibrées représentaient le plus grand groupe d'anomalies chromosomiques chez les couples consultants pour des avortements à répétition. Elles ont été trouvées chez 460 personnes sur les 36620 cas étudiés (1,3%), ce qui était 15 fois plus élevé que les travaux précédents. La fréquence avec laquelle les chromosomes étaient impliqués dans ces translocations réciproques a montré de grandes variations. Une analyse statistique de la distribution des bras chromosomiques impliqués dans ces translocations (en utilisant des simulations Monte-Carlo) a montré l'implication de tous les chromosomes dans les échanges, cependant certains étaient préférentiellement impliqués, 2p, 5q, 7p, 7q, 12q, 13q, 17q, 18p et 22q.

❖ Les translocations robertsoniennes

C'est un type de réarrangement qui implique deux chromosomes acrocentriques qui fusionnent près de la région centromérique avec perte des bras courts. Des translocations robertsoniennes ont été identifiées impliquant toutes les combinaisons des chromosomes acrocentriques. Les chromosomes les plus couramment impliqués dans les translocations sont 13 et 14 et sont observées chez environ une personne sur 1300. Comme les autres translocations, les porteurs de translocations robertsoniennes sont phénotypiquement normaux, mais il existe un risque de donner des gamètes déséquilibrés, ce qui entraîne soit des avortements ou une descendance anormale.

Même si l'incidence signalée de translocations chromosomiques équilibrées chez les couples avec des avortements spontanés à répétition (ASR) variait de 1,3% à 22,7% [Stenchever, Jarvis & Macintyre, 1968] [Wingate, 1965]; aucune translocation équilibrée n'a été trouvée dans une étude portant sur 100 couples avec au moins trois avortements à répétition [Ward et al. 1980]. Cependant, des variations chromosomiques et des formes en mosaïque comme 45,X/46,XX ont été trouvées chez quelques couples [Ward Henry et Robinson, 1980].

Campana et al (1986) ont étudié 5445 couples ayant des antécédents d'avortements récurrents. Chez 5% des couples, un membre était porteur d'une translocation équilibrée qui était soit réciproque (2/3 des cas) soit robertsonienne (1/3). De plus, certains chromosomes étaient préférentiellement impliqués dans les translocations réciproques par rapport à d'autres. En particulier, il y avait un excès de cassure sur les chromosomes 6, 7 et 22 par rapport aux autres chromosomes. Le moins de cassure se trouvait sur le chromosome 12.

❖ Les translocations sautantes et pertes des télomères

Les translocations sautantes (TS) sont des anomalies chromosomiques rares dans lesquelles une copie identique d'une région chromosomique (donneur) est transférée à plusieurs chromosomes (receveur). La plupart des translocations sautantes impliquent des chromosomes acrocentriques avec une caractéristique, c'est que le site des cassures se trouve généralement dans des zones d'ADN répétitif (régions télomériques, centromériques ou hétérochromatiques). La distribution se fait de manière aléatoire au niveau du chromosome receveur mais avec une implication préférentielle des segments télomériques. Cela a conduit à l'hypothèse que des séquences télomériques répétitives pourraient être impliquées dans la survenue de translocations sautantes [Lefort et al, 2001].

Des études par hybridation in situ en fluorescence (FISH) ont signalé l'implication des séquences télomériques interstitielles aux sites jonctionnels des translocations sautantes [Park et al, 1992, Vermeesch et al., 1997]. Le premier travail sur les TS en cas d'avortement a été rapporté par Levy et al. (2000) dans deux cas. Dans le premier cas, le donneur était le chromosome 15 et les chromosomes récepteurs étaient 1, 9, 15 et 21 impliquant des régions hétérochromatiques et leurs centromères. Le deuxième cas a été observé avec un réarrangement résultant d'une translocation présumée de novo 8; 21. Trois lignées cellulaires de TS ont été observées. Elles consistaient en un chromosome 8p supprimé, une translocation dicentrique 8;21 et un isochromosome 8q. Les régions d'instabilité semblaient se trouver dans la région péracentromérique du chromosome 8 et la région satellite du chromosome 21.

➤ Exemples de translocation sautante

L'identification GTG des chromosomes participant à une translocation sautante (TS), la partie receveuse de la TS est alignée avec son homologue normale (étiquetée N) [Levy et al, 2000]. Les télomères sont des séquences aux extrémités des chromosomes qui protègent les extrémités du chromosome contre les dommages et empêchent les chromosomes de fusionner en anneaux ou de se lier au hasard les uns aux autres. Comme la plupart des bandes terminales du chromosome humain sont à bande G négative, il est difficile d'identifier les aberrations chromosomiques cryptiques ou subtiles, y compris les régions télomériques. Même toute la peinture chromosomique (wcp : whole chromosome paint)-les sondes FISH qui détectent les translocations chromosomiques, les réarrangements chromosomiques multiples et les chromosomes marqueurs ne révèlent pas de subtils changements chromosomiques, en particulier ceux qui se produisent dans les régions télomériques [Wakui et al, 1999].

Les rapports relatifs à l'implication des extrémités télomériques des chromosomes dans les cas d'échec reproductif étaient contradictoires. L'implication du chromosome 3/10 et 20/D dans les régions subtélomériques a été catégoriquement déclarée impliquée comme base moléculaire dans les cas d'avortement [Yakut et al, 2002]. Cela n'a été identifié qu'en utilisant des sondes spécifiques aux télomères mais pas par des techniques de cytogénétique de routine. Dans l'un des cinq couples souffrant d'avortement à répétition étudiés, une translocation cryptique entre le chromosome 3 et 10, et entre le chromosome 20 et un chromosome du groupe D ont été identifiées. Bien que l'utilisation de sondes

téломériques n'ait pas révélé de translocations cryptiques dans une autre étude impliquant un plus grand nombre de cas (100 patients) [Benzacken et al, 2002].

2.4 LES REARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES COMPLEXES (CCR) ET ASP

Les réarrangements chromosomiques complexes (RCC) sont des anomalies de structure impliquant au moins trois chromosomes avec trois points de cassure ou plus. La plupart de ces réarrangements ne peuvent être révélés que par des techniques de cytogénétique moléculaire telles que FISH et Array-CGH. Un certain nombre de réarrangements a été considéré comme des translocations équilibrées; tandis qu'avec les techniques moléculaires, il a été déterminé en tant que RCC [Delaroche et al. 1995, Fuster et al, 1997 ; Ciccone et al, 2005]. Le risque d'avortement chez les personnes atteintes de RCC semble être plus élevé que celui d'un porteur de translocation réciproque équilibrée simple. Les adultes phénotypiquement normaux porteurs de réarrangement chromosomique complexe équilibré ont un risque d'avortements spontanés de 50% et un risque de 20% de produire un caryotype déséquilibré chez leurs nouveau-nés. Alors qu'il entraîne souvent une infertilité primaire chez les porteurs de sexe masculin [Madan et al, 1997].

L'anomalie chromosomique complexe implique des chromosomes acrocentriques du groupe D&G, dans une famille avec échec de la reproduction ; l'implication d'un réarrangement complexe était, une translocation robertsonienne entre les chromosomes 13 et 14; et l'autre était une translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 14 et 22 [Lespinnasse et al. 2003].

2.5 LES ANOMALIES DU CHROMOSOME X ET LES AVORTEMENTS SPONTANES PRECOSES

Les anomalies chromosomiques impliquant le chromosome X sont généralement numériques comme 47,XXX & 45,XO ou sous forme mosaïque, c'est-à-dire 46, X/47, XXX & 46, XX/45, XO. Les anomalies de structure comme les inversions, à la fois péricentrique et paracentrique, la formation d'anneaux, dicentrique, isoarm et la perte/délétion des bras sont également largement signalées [Ioan et al.1978, Sachs et al.1985, Horsman et al.1987, Wu et al. 1993]. Les femmes présentant une anomalie chromosomique sexuelle triple «X » peuvent être fertiles. Mais il y a un risque accru d'avortement ou de donner naissance à un nouveau-né génétiquement anormal. Néanmoins, des études sur des femmes XXX fertiles ont montré une faible incidence d'anomalies chromosomiques chez leurs bébés. Cependant, dans une étude portant sur 100 couples dans laquelle un cas était de 46,XX/45,X avec des antécédents d'avortement à répétition. Aucune translocation n'a été observée dans ce cas [Wad et al, 1980].

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 PATIENTS

L'échantillon étudié est trente couples, soit 60 individus, ayant vécu l'expérience de deux avortements spontanés précoces, au moins durant leur vie reproductive. Ils sont originaires de la région de Chichaoua, et ont accepté volontairement de participer à l'étude.

Les informations relatives à chaque couple, ont été recueillies moyennant une fiche d'exploitation détaillée (annexe 1). Le carnet de suivi des grossesses (carnet de santé de la femme) nous était d'une grande utilité (Figure 18).

L'accueil des couples a lieu à la maternité de l'hôpital Mohammed VI de Chichaoua. Après avoir expliqué à chaque couple la finalité de notre travail et après avoir eu leur consentement éclairé, nous avons programmé le jour du prélèvement sanguin. L'échantillon est prélevé un jour avant la mise en culture, à jeun et d'une façon stérile pour éviter toute contamination. Un volume de 15ml est prélevé sous vide dans un tube hépariné stérile. L'acheminement des prélèvements au Laboratoire de Cytogénétique de la faculté des Sciences et Techniques de Settat est fait le jour de la mise en culture.



Figure 18: Carnet de santé de la femme [Ministère de santé, Maroc 2016]

2 DESCRIPTION DE L'ÉCHANTILLON

➤ Critères d'inclusion

Sont inclus dans l'étude tous les couples encore en période d'activité génitale ayant eu au moins deux avortements spontanés précoces dans leur antécédents et dont le dernier remonte au plus tard les trois derniers mois précédents le début de l'étude. Ces couples ont eu plusieurs investigations pour avoir une explication à leur problème reproductif (FCR) afin d'y remédier. Mais aucun couple n'a subi auparavant une étude cytogénétique (caryotype).

➤ Critères d'exclusion

Sont exclus de l'étude les couples qui :

- ne font pas partie de la définition de fausses couches à répétition ;
- ont eu le dernier accident abortif, plus de trois mois auparavant ;

- et enfin, en cas de données manquantes.

3 CULTURE CELLULAIRE

Les trois tests ont été réalisés à la fois au niveau de la même culture cellulaire.

3.1 Milieu de culture

La culture des lymphocytes est faite dans le milieu de «Roswell Parck Memoreil Institute» RPMI-1640-Medium. Il s'agit d'un milieu riche qui favorise une bonne prolifération des lymphocytes. Le milieu RPMI 1640 contient tous les éléments de base nécessaires pour la croissance de la plupart des cellules de mammifères, des acides aminés, des vitamines, des sels organiques et autres composants. Ce milieu de culture doit être stérilisé après l'avoir complété, avant la mise en culture, par :

- Milieu de culture préparé : RPMI 1640 5mL
- Sérum de veau fœtal 15%
- Phytohémagglutinine (PHA) 1%
- Antibiotique (Pénicilline /Streptomycine) 1%

Les lymphocytes du sang périphérique bloqués en phase (G0) nécessitent le recours à un stimulus, les introduisant à nouveau en phase (G1) et les réintégrant dans un cycle cellulaire. Pour ce faire, la Phytohémagglutinine (PHA) 1%, est un agent mitogène [Obe et al., 1975], stimulant la division des lymphocytes mis en culture. Les antibiotiques sont ajoutés pour inhiber toute croissance bactérienne pouvant nuire au développement des cellules en culture. Enfin, le milieu de culture est stérilisé par filtration en utilisant le système millipores de 0,22 µm de diamètre. Cette dimension de pores élimine tout risque de contamination.

3.2 Mise en culture

La culture se fait dans des conditions aseptiques, sous une hotte à flux laminaire. Un volume de 0,5 mL du sang total est mis en présence de 5mL du milieu préalablement préparé dans des tubes de cultures. Le contenu des tubes est homogénéisé soigneusement. Ces derniers sont disposés inclinés dans le bain-marie à 37°C pendant 72 h, durée de vie convenable aux cellules (Figure 19).

3.2.1 Test des Micronoyaux

Réalisé selon la technique de Fenech et Morley, (1985). Le blocage de la cytodivision des cellules se fait par la cytochalasin-B qui empêche la division cytoplasmique, alors que celle du noyau se déroule tout à fait normalement. Après 44h de culture, une solution de cytochalasin-B (≥98%) a été ajoutée à raison de 0,1 mL par tube. Les tubes sont homogénéisés manuellement, puis sont remis au bain-marie à 37°C pendant 28 heures.

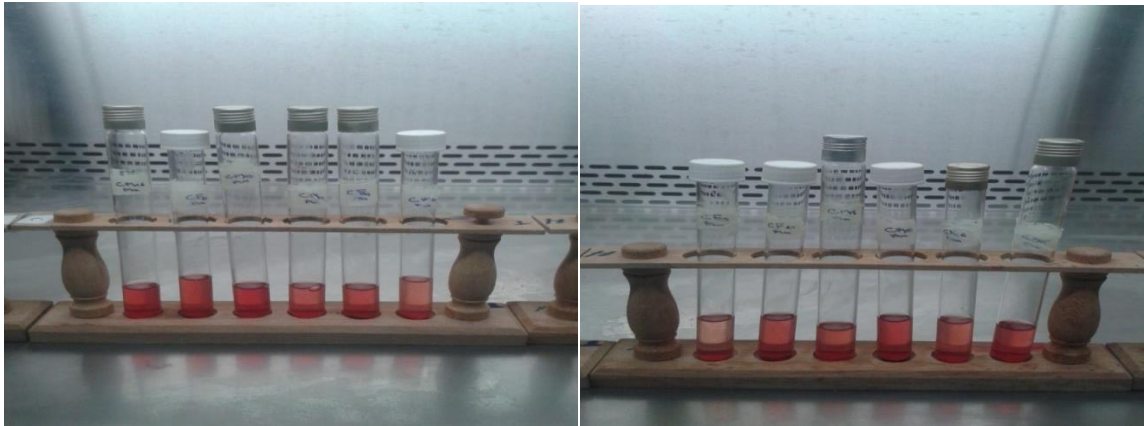


Figure 19: Les tubes de culture cellulaire des lymphocytes du sang périphérique des couples

3.2.2 Test des aberrations chromosomiques et test des échanges entre les chromatides sœurs

Pour les tests des AC et des ECS, le sang total a été ajouté à un milieu de culture complété par le bromodéoxyuridine à concentration de 0,25mg /mL. Les cultures ont été incubées à l'obscurité à 37°C pendant 72h. Le blocage des chromosomes en phase métaphase a été effectué par l'ajout de la colchicine avec une concentration de 0.004mg/mL (à raison de 1 mL par tube) avant les trois dernières heures de l'arrêt de la culture cellulaire [Obe, 2002 et Akyil, 2015].

3.3 Traitement cytologique

3.3.1 Choc hypotonique

❖ Test des micronoyaux, test des aberrations chromosomiques et test des échanges entre les chromatides sœurs

Le choc hypotonique est effectué à l'aide du chlorure de potassium KCl (0,075M) froid, qui entraîne le gonflement des cellules. Au bout de 72 heures, les cultures sont centrifugées pendant 8 minutes à 800 tours/minutes pour le test MN et 5 minutes à 2500 tours/minutes pour le test des AC et le test des ECS. Le surnageant est ensuite éliminé par aspiration à l'aide de la pipette Pasteur. Les culots cellulaires sont remis en suspension dans la solution de chlorure de potassium KCl à (0,075M) pendant 10 min pour les tests (AC) et (ECS). L'homogénéisation se fait à l'aide d'un vortex adapté aux tubes à centrifuger.

3.3.2 Fixation des lymphocytes

❖ Test des micronoyaux, test des aberrations chromosomiques et test des échanges entre les chromatides sœurs

Une fois le choc hypotonique est effectué, les tubes sont à nouveau centrifugés à 800tr/min, pendant 8 minutes pour le test de MN et à 2500 tr/min, pendant 5 minutes pour les AC et les ECS, le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans une solution fixatrice (Méthanol/Acide Acétique 3:1). Le fixateur a pour objectif de figer les lymphocytes, c'est une action dénaturante sur les protéines et

notamment l'hémoglobine. Il permet d'éliminer les globules rouges rendus fragiles par le choc hypotonique. Le culot obtenu est remis en suspension, et on ajoute le fixateur goutte à goutte jusqu'à ce que la suspension devienne noire, puis on complète jusqu'à 5 ml avec le fixateur tout en homogénéisant au vortex. La fixation est répétée deux à trois fois jusqu'à ce que les suspensions deviennent claires.

3.3.3 Etalement des lymphocytes sur les lames

L'étalement se fait à l'aide d'une pipette Pasteur sur des lames rodées, propres et dégraissées.

3.3.4 Coloration et analyse microscopique

A-Test des micronoyaux et test des aberrations chromosomiques

La coloration se fait par le Giemsa 5% (pH 6.8). Les lames sont introduites dans une cuve de coloration contenant le Giemsa pendant 8 à 10 minutes, puis lavées à l'eau distillée et séchées à température ambiante. La lecture est effectuée à l'aide du microscope photonique (Objectif (x40) et (x1000) pour (AC)) (Figure 20).

B- Test des échanges entre les chromatides sœurs

La technique de coloration des ECS consiste à une coloration de FPG (Fluorescent-Photolyse-Giemsa). Les lames sont introduites dans une solution de Hoescht, puis lavées à l'eau distillée. Après l'ajout de 3 à 4 gouttes de PBS, les lames sont couvertes par les lamelles et mises dans les chambres humides puis placées sous la lumière pendant 24h, après elles sont lavées et remises dans une solution de SSC (Standard Saline Citrate)(5x) diluée et placées dans un bain marie à 65°C pendant 1h, puis les lames sont introduites dans une coloration de Giemsa 5% préparée dans SSC (Standard Saline Citrate)(5x) diluée. Après un lavage à l'eau distillée, ces lames sont séchées à température ambiante. La lecture est effectuée à l'aide du microscope photonique (Objectif (x1000) (Figure 20).

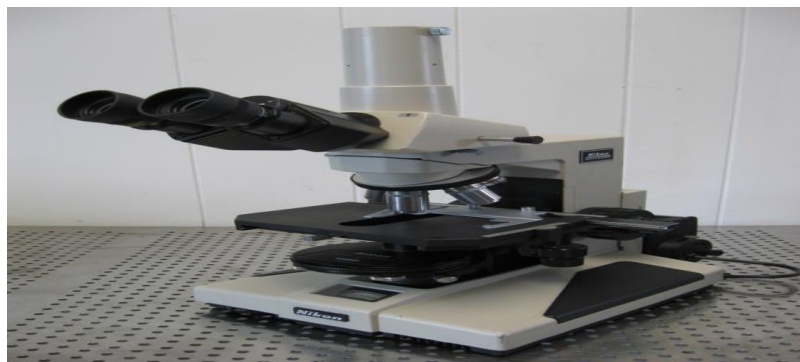


Figure 20: Microscope photonique

4 BIOMARQUEURS UTILISES

4.1 TEST DES MICRONOYAUX

Pour évaluer le taux de dommages au niveau du matériel génétique (ADN), la mesure de l'indice de prolifération cellulaire (IP) et la numération du taux des micronoyaux (MN) ont été effectuées. Pour chaquetube, la mesure de l'IP est calculée sur 1000 lymphocytes analysés. Pour le test des micronoyaux, seuls les lymphocytes binuclés sont observés.

Le test des micronoyaux a été développé par Fenech et Morley en 1985. Il consiste à étudier les pertes du matériel génétique sous forme d'un micronoyau, il est simple à réaliser, en plus d'être rapide ; ses plus grands avantages sont la fiabilité et le coût peu élevé de la technique. Ce test est largement utilisé en épidémiologiémoléculaire et en cytogénétique pour évaluer la présence et l'étendue des dommages chromosomiques dans la population exposée à des agents génotoxiques ou pour étudier un profil génétique [Fenech, 1999].

En outre, ce test permet également de calculer l'indice de prolifération qui apporte des informations sur la division nucléaire, en mesurant les proportions des cellules mono, bi, tri et tétranucléés par l'analyse au moins de 500 cellules stimulées [Fenech et al., 2003]. Le choix des cellules binucléées doit respecter les critères suivants établis par le projet international de MN humains (HUMN project) [Fenech et al., 2003] :

- Les cellules doivent obligatoirement être binucléées.
- Les deux noyaux doivent avoir leur membrane nucléaire intacte, avoir approximativement la même taille, même taches et même intensité de coloration.
- Les deux noyaux peuvent se toucher mais ne doivent pas se chevaucher. Les limites des deux noyaux doivent être nettement distinctes.
- Les limites du cytoplasme doit être intactes et nettement distinctes de celle des cellules adjacentes.
- Le diamètre moyen du MN varie de 1/16 à 1/3 des noyaux principaux.
- Les MN sont non rétractiles et facilement distincts des artefacts.
- Les MN ne doivent pas être reliées aux noyaux principaux.
- Le MN ne doit pas chevaucher sur l'un des 2 noyaux principaux.
- Les MN ont habituellement de même intensités de coloration que les noyaux principaux

4.2 TESTS DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES ET DES ECHANGES ENTRE LES CHROMATIDES SŒURS

Le test des aberrations chromosomiques consiste à étudier les anomalies de structure et de nombre des chromosomes. Elles sont dites déséquilibrées quand elles s'accompagnent de perte ou de gain en matériel génétique codant ; elles sont dites équilibrées quand tous les gènes sont présents en deux exemplaires. Les aberrations chromosomiques de structure sont secondaires à des cassures suivies ou non d'un réarrangement incorrect. Elles se traduisent par des fusions chromosomiques, des translocations (échanges de segments chromosomiques), des délétions (pertes d'un segment chromosomique), des duplications (gains d'un segment chromosomique).

Pour l'évaluation des AC, une centaine de métaphases bien étalées ont été analysées par tube. 1000 cellules de chaque tube ont été analysées pour obtenir l'indice mitotique (IM) [Mamur et al. 2012]. L'IM est mesuré sur chaque étalement au microscope optique (x40) à partir de l'examen de 1000 cellules par tube de culture. Puis les aberrations chromosomiques sont analysées au grossissement (x1000). Après l'examen de 100 métaphases, les anomalies de structure (cassures, lacunes, chromosomes acentriques-dicentriques et réarrangements) sont comptabilisées et les résultats (%) sont exprimés en terme de métaphases anormales.

Les échanges entre les chromatides sœurs (ECS) découlent de cassures dans l'ADN et de la réversion des fragments brisés à une position presque équivalente après échange entre les deux chromatides sœurs d'un même chromosome et par conséquent leur formation dépendent de la phase S du cycle cellulaire ou des processus de duplication de l'ADN. L'analyse de la fréquence des ECS est basée sur l'évaluation de 25 métaphases en deuxième division et sur l'indice de réplication (IR) [Iazutka, 1991].

5 METHODES DE CALCUL

5.1 INDICE DE PROLIFERATION (IP)

Cet indice est complémentaire au test des micronoyaux. Il permet de mesurer indirectement la durée du cycle cellulaire et d'apporter des informations sur la division cellulaire. La mesure de l'IP a été effectuée par comptage des cellules mono, bi, tri et tétranuclées sur 1000 cellules stimulées pour chaque individu est calculé comme suit [Hilali et al., 2008, Maes et al., 1993].

$$IP = \frac{(1 \times N1) + (2 \times N2) + (3 \times N3) + (4 \times N4)}{1000 \text{ cellules analysées stimulées}}$$

1000 cellules analysées stimulées

N1= nombre des cellules mononuclées ; N2= nombre des cellules binuclées ; N3= nombre des cellules trinuclées ; N4= nombre des cellules tétranuclées (Figure 21).

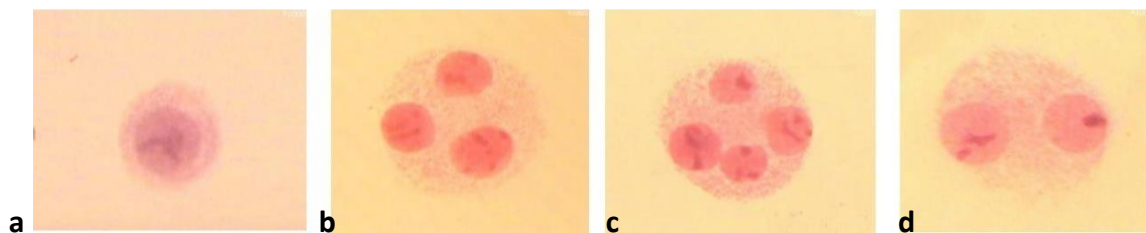


Figure 21: Cellules Mono (a), bi (d), tri (b), tétranuclées (c) [Amahdar, 2011]

5.2 FRÉQUENCE DES MICRONOYAUX

La numération du taux des micronoyaux est calculé par comptage du nombre des micronoyaux dans 1000 cellules binuclées observés pour chaque individu [Hilali et al., 2008].

$$\text{Fréquence de MN} = \frac{(1 \times MN1) + (2 \times MN2) + (3 \times MN3) + (4 \times MN4)}{1000 \text{ cellules binuclées}}$$

1000 cellules binuclées

MN1= nombre des cellules binuclées avec 1 Micronoyau ; MN2= nombre des cellules binuclées avec 2 Micronoyaux ; MN3= nombre des cellules binuclées avec 3 Micronoyaux ; MN4= nombre des cellules binuclées avec 4 Micronoyaux (Figure 22).



Figure 22: Cellule binucléée normale (a) et binucléée avec un micronoyau (b) [Amahdar, 2011]

5.3 INDICE MITOTIQUE

Le test des AC est complété par l'étude de l'indice mitotique IM, correspondant aux nombres des métaphases sur 1000 cellules stimulées (Figure 23), et aussi permet d'apporter des informations sur la division cellulaire [Hilali et al. 2008].

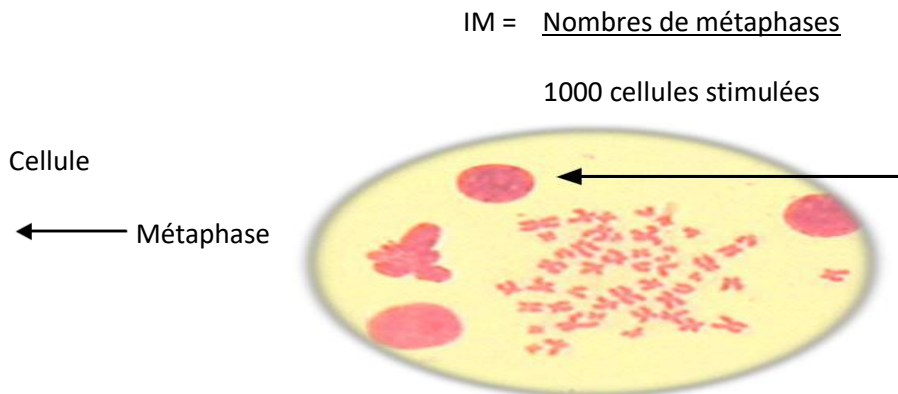


Figure 23: Champ de vision au microscope permettant le calcul de l'indice mitotique [Amahdar, 2011]

5.4 INDICE DE STIMULATION

Les tests MN et AC sont complétés aussi par l'étude de l'indice de stimulation, qui correspond aux nombres des cellules stimulées sur 1000 cellules analysées.

$$IS = \frac{\text{Nombres cellules stimulées}}{1000 \text{ cellules analysées}}$$

5.5 ECHANGE ENTRE LES CHROMATIDES SCEURS ET INDICE DE REPLICATION

Pour le dosage des ECS, les métaphases en deuxième division qui ont été ciblées lors de l'analyse microscopique (Figure 24), et un total de 25 métaphases aux premières, deuxièmes et troisièmes mitoses a été marqué. En outre, le total des cellules de chaque tube a été reçu pour la détermination de l'indice de réplication (IR) calculé selon la formule suivante:

$$IR = \frac{(1 \times M1) + (2 \times M2) + (3 \times M3)}{N}$$

M1: nombre des cellules subissant une première mitose; M2: nombre des cellules subissant une deuxième mitose; M3: nombre des cellules subissant une troisième mitose; N: nombre de métaphase

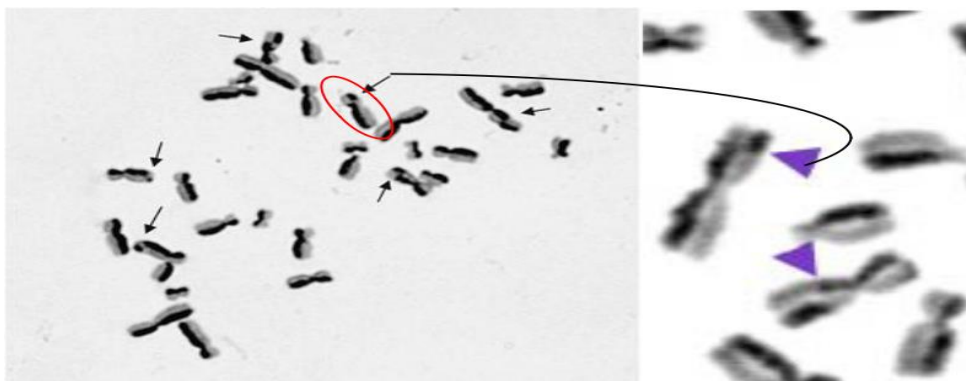


Figure 24: Métaphase en deuxième division avec échange entre les chromatides sœurs [Hagelstrom, 2008]

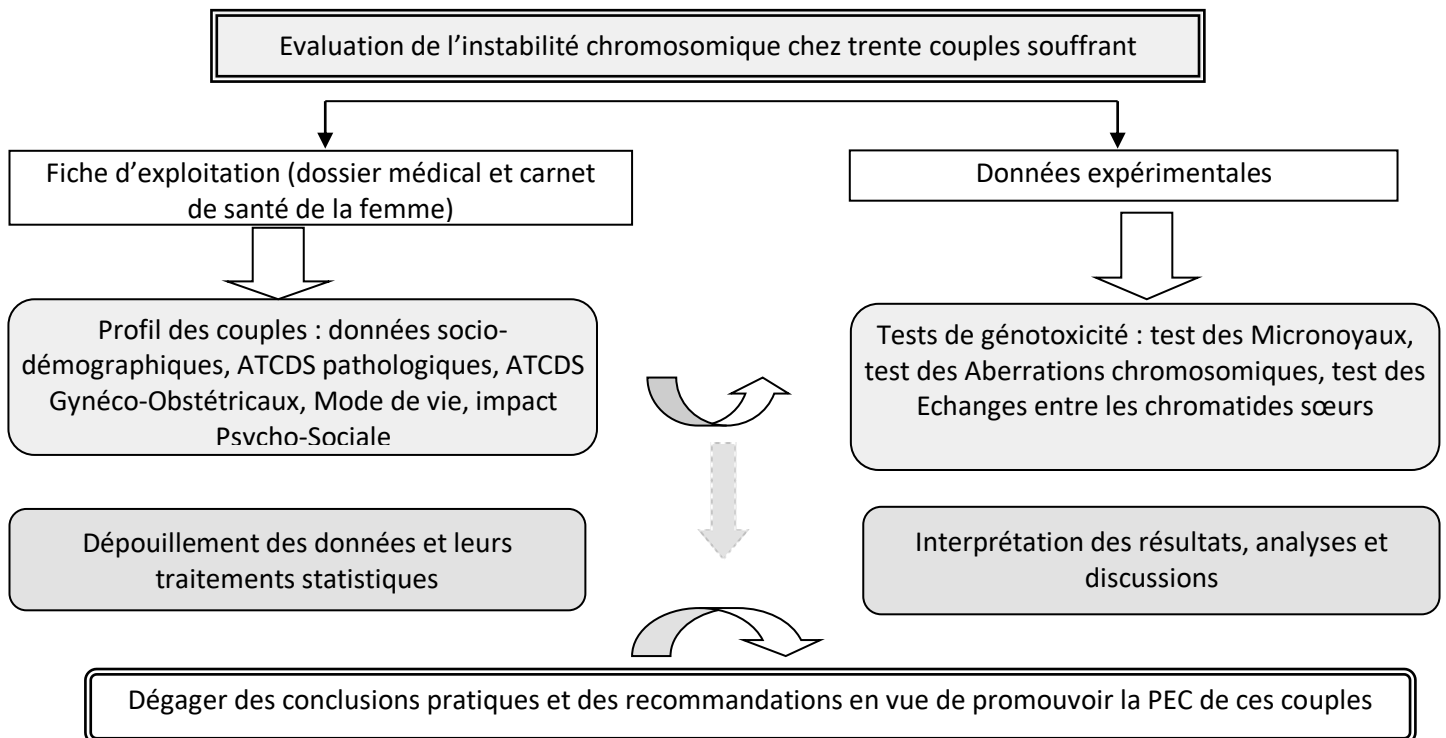
6 CAS TEMOINS

Les valeurs des biomarqueurs étudiés (MN, IP, AC, IS, IM, ECS et IR) relatives aux cas témoins, sont les valeurs de références du laboratoire de cytogénétique de la faculté des sciences et techniques de Settat.

7 ANALYSE STATISTIQUE

Les données de cette étude ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS v 23 et microsoft Excel. Les méthodes d'analyses statistiques adoptées pour traiter les résultats obtenus sont : Une analyse descriptive, la valeur t student, test Krauskal-Wallis, corrélation de rho-spearman et l'Analyse en composante principale. Le niveau de probabilité retenu est de 5%. L'analyse teste l'hypothèse selon laquelle chaque échantillon provient de la même distribution de probabilité sous-jacente par rapport à l'hypothèse contraire selon laquelle les distributions de probabilité ne sont pas les mêmes pour les échantillons.

8 VUE D'ENSEMBLE SUR LA METHODOLOGIE



Contribution à l'amélioration de la PEC des couples souffrant d'ASPR

NB : le test des échanges entre les chromatides sœurs a été réalisé seulement chez 12 couples (faute de moyens).

RESULTATS

ANALYSE DESCRIPTIVE

1 INTRODUCTION

Les résultats de l'étude, objet de cette partie, seront présentés d'une manière succincte. Ainsi, sera abordé en premier lieu, une description de notre échantillon : les données sociodémographiques, le mode de vie, l'histoire gynéco-obstétricale des femmes, le nombre de fausses couches et sa relation avec les principales variables, l'impact psycho-sociale du vécu des fausses couches à répétition (FCR), et une étude des paramètres influençant l'évolution de la grossesse. En suite, seront présentés les résultats des tests cytogénétiques en comparaison avec les témoins, l'évolution des différents biomarqueurs de génotoxicité en fonction des variables étudiées, enfin la réalisation des corrélations et d'une analyse en composante principale.

2 CARACTERISTIQUES SOCIODEMOGRAPHIQUES DE L'ECHANTILLON ETUDIE

2.1 ORIGINE GÉOGRAPHIQUE

Plus de la moitié (57%) est originaire et résidente en milieu rurale. Le reste (43%) est originaire et résident en milieu urbain (Figure 25).

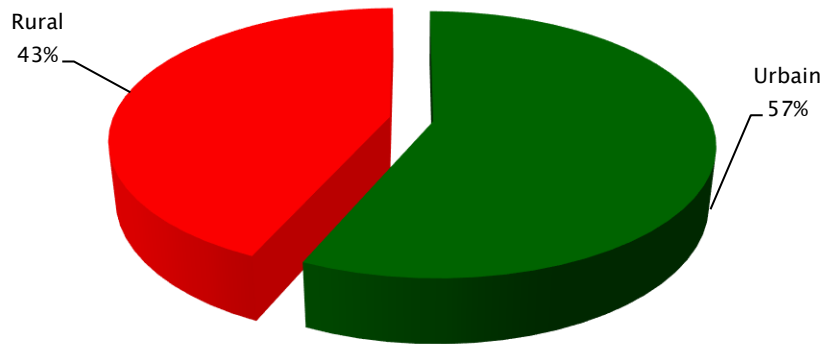


Figure 25: Origine géographique des couples étudiés

2.2 REPARTITION DE L'ECHANTILLON SELON L'AGE

2.2.1 Âge maternel

L'âge des femmes varie entre 19 et 41 ans [19-41 ans]. Leur âge moyen est de $(30,43 \pm 1,008)$ ans. La classe d'âge [31-41 ans] comme le montre la figure (26) représente 60% des cas et la classe d'âge [19-30 ans] représente 40% des cas.

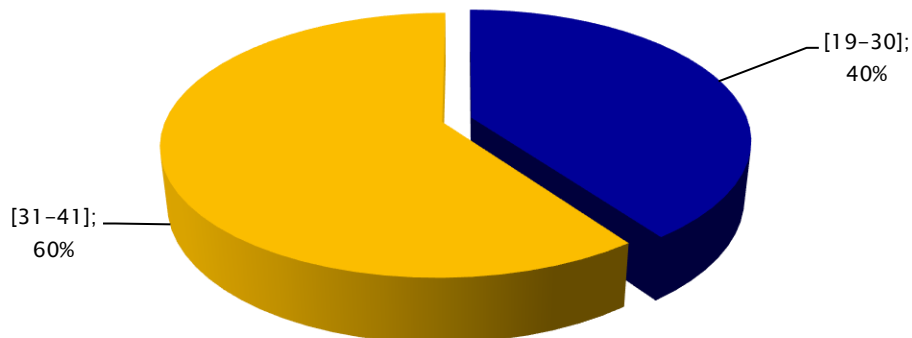


Figure 26: Répartition de l'échantillon selon l'âge maternel

2.2.2 Âge paternel

L'âge des hommes varie de 23ans à 52ans [23-52ans]. Leur âge moyen est de (36,17±1,414 ans). Comme le montre la figure (27), la classe d'âge [34-44 ans] représente plus de la moitié (53,34%). Les classes d'âge [23-33 ans] et [45-52 ans] représentent respectivement 33,33% et 13,33% (Figure 27).

2.3 NIVEAU INTELLECTUEL, SOCIOECONOMIQUE ET COUVERTURE SANITAIRE

90% ont un bas niveau intellectuel, 6,7% ont un niveau moyen, et seulement 3,3% ont un haut niveau (Figure 28). La moitié (50%) des couples est de bas niveau socio-économique, l'autre moitié est d'un niveau moyen et 96,7% ont déclaré ne pas avoir une couverture sanitaire.

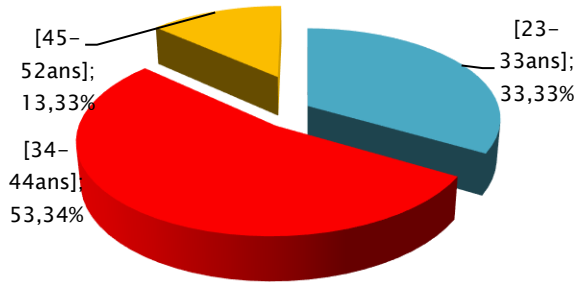


Figure 27: Répartition de l'échantillon selon l'âge paternel

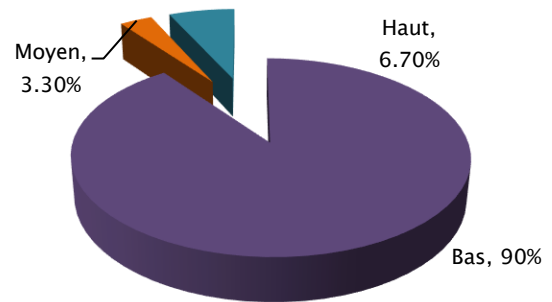


Figure 28: Répartition selon le niveau intellectuel

2.4 OCCUPATIONS DES COUPLES ETUDIÉS

La majorité écrasante des femmes étudiées (86,67%), sont des femmes au foyer (Figure 29). 36,67% des hommes sont des agriculteurs, 16,67% ont des travaux occasionnels, 10% sont des chauffeurs et le reste (36,66%) ont des professions variées (mécanicien, vendeur, épicier, coursier, fkih, militaire) (Figure 30).

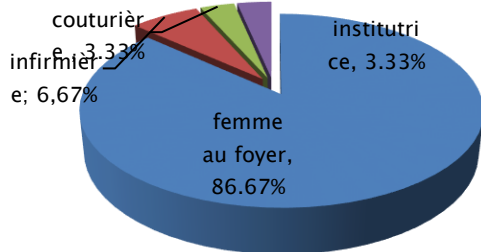


Figure 29: Répartition des femmes selon leurs occupations

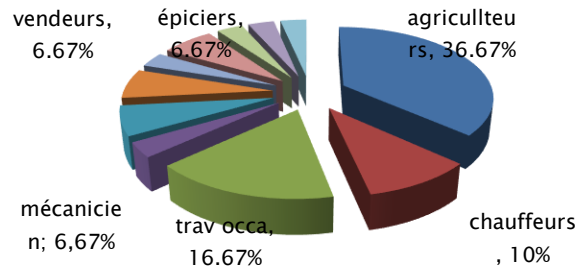


Figure 30: Répartition des hommes selon leurs occupations

3 NOTION DE CONSANGUINITE ET CAS SIMILAIRES DANS LA FAMILLE

La notion de consanguinité n'a concerné que 16,7% des couples (5 couples) (Figure 31), et deux couples seulement ont rapporté la notion de cas similaire chez un membre de la famille (maladie abortive).

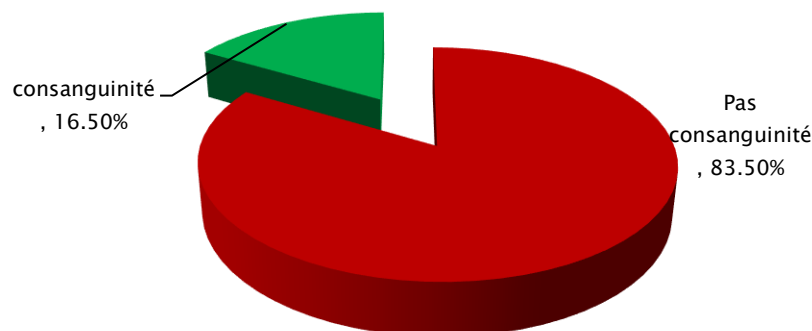


Figure 31: Répartition des couples selon la consanguinité

4 MODE DE VIE DES COUPLES

23,3% des hommes sont des fumeurs (20 paquets/année en moyenne), et leurs partenaires sont exposées à la fumée du tabac (tabagisme passif). Aucune des femmes ni tabagique et personne des des couples ne consomme de l'alcool. 93,3% des femmes ont déclaré être des consommatrices de thé et 30% d'entre elles des consommatrices de café. Tandis que 100% des hommes consomment du thé et 60% consomment du café.

26,7% des femmes ont réclamé avoir consommé des plantes médicinales comme remède à leur maladie abortive. Tous les couples ont rapporté le fait qu'ils ne pratiquent aucune activité sportive.

53,3% des couples vivent sur l'eau du robinet, 36,7% sur l'eau de puits et 10% seulement sur l'eau de source (Tableau 9).

Tableau 5: Mode de vie des couples

Mode de vie	Femmes	Hommes
- Tabagisme	0%	23,3% (20 paquets/année)
- Alcool	0%	0%
- Thé (verre/jour)	93,3%	100%
1 verre	5%	2%
2 verres	15%	10%
>=3 verres	80%	88%
- Café (tasse/jour)	30%	60%
1 tasse	40%	10%
2 tasses	30%	70%
>=3 tasses	30%	20%
- Activité sportive	0 %	0 %
- Eau robinet	53,3%	53,3 %
- Eau de puits	36,7%	36,7 %
- Eau de source	10%	10 %
- Prise de Plantes médicinales	26,7%	0%

Les femmes en surpoids représentent 76,67% des cas et les obèses 3,33% des cas(Figure 32).

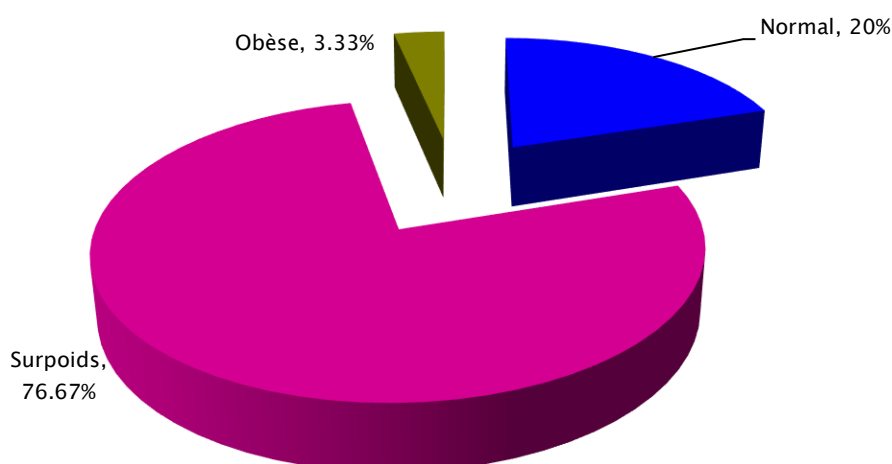


Figure 32: Répartition des femmes selon l'IMC

5 ANTECEDENTS PATHOLOGIQUES

5.1 ANTECEDENTS MEDICAUX ET CHIRURGICAUX

86,7% des femmes rapportent n'avoir aucun antécédent pathologique particulier, et seulement 13,3% avait un antécédent pathologique (goitre, lithiase vésiculaire, diabète, hypertension artérielle, infection sexuellement transmissible) (Figure 33). Pour les hommes, un seul homme rapportent avoir été traité pour une infection sexuellement transmissible (IST) dans ses antécédents.

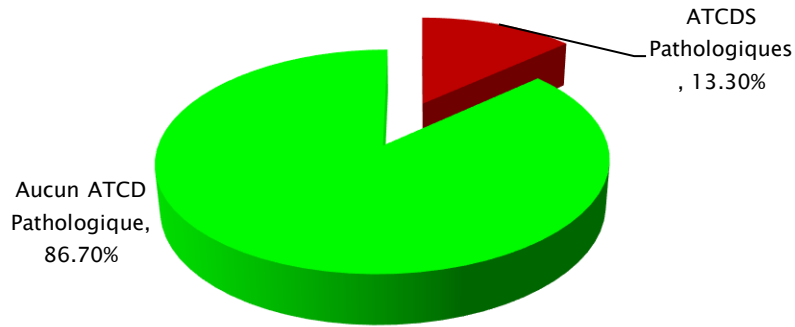


Figure 33: Répartition des femmes selon leur ATCDS pathologiques

5.2 ANTECEDENTS GYNECOLOGIQUES

Trois femmes avaient un (10%) antécédent gynécologique :

- une salpingéctomie pour une grossesse extra-utérine (01) ;
- une polypéctomie pour un polype utérin (01) ;
- et un kyste ovarien simple traité médicalement (01).

L'âge moyen à la ménarche est de 12,67ans, l'âge le plus jeune est 10ans et l'âge maximum est 15ans [10-15ans]. Plus de 56% (56,67%) des femmes de cette étude ont eu leurs premières règles entre l'âge de 12 et 13 ans [12-13ans]. 16,66% des autres femmes ont eu leur premières règles à un âge compris entre 10 et 11ans [10-11ans], et 26,67% entre 14 et 15ans [14-15ans] (Figure 34).

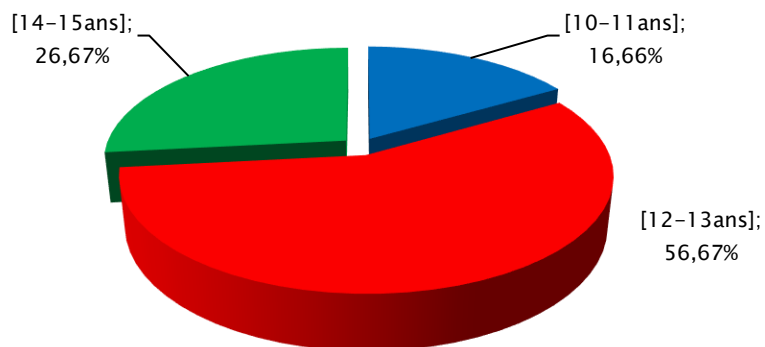


Figure 34: Répartition des femmes selon l'âge à la ménarche

L'âge moyen des femmes au mariage est de 25,17ans [15-33ans]. La durée moyenne du mariage des couples est estimée à 5,23ans [2-16ans]. L'âge moyen à la première grossesse est 25,63ans [15-34ans], tandis que l'âge moyen à la première fausse couche est de 26,43 ans [15-35ans]. 86,7 %des femmes ont déclaré avoir utilisé une contraception orale comme méthode contraceptive (EP) pour une durée moyenne

de 31 mois. Le délai entre l'arrêt de la contraception et la grossesse est de 1,96 mois en moyenne. 13,3% des femmes n'ont jamais utilisé de méthode contraceptive.

5.3 ANTÉCÉDENTS OBSTÉTRICAUX

D'après l'étude 98,6% des grossesses ont été spontanées, désirées dans 92,1% des cas et induites dans seulement 1,40% des cas. Les 30 femmes étudiées ont eu la chance de tomber enceinte 139 fois, durant leur vie reproductive jusqu'au moment de l'enquête sur une durée de mariage de 5,23 ans en moyenne [2-16ans].

Le délai inter génésique (DI) moyen est de (8,2 mois ±1,13) [0-132 mois]. Le délai protogénésique moyen est de (5,13 mois) [1-18 mois].

La gestité moyenne des couples est de (4,63±0,37) avec un minimum de deux et un maximum de 12 grossesses. Les couples qui ont eu cinq grossesses ou plus représentent 40%, suivis respectivement par ceux qui ont eu quatre grossesses (36,70%), puis trois grossesses (16,70%) et en dernier les couples qui ont eu seulement deux grossesses (6,60%) (Figure 35).

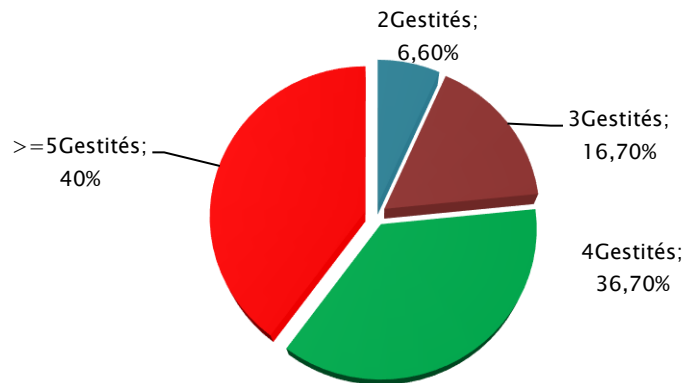


Figure 35: Répartition de l'échantillon selon la gestité

La parité moyenne des couples est de (1,4±0,212) avec un minimum d'aucune parité et un maximum de quatre parités. Ainsi, le classement des couples selon leur parité, a montré que les couples qui ont une seule parité représentent (36,70%), et ceux qui ont trois parités et plus représentent (16,70%), tandis que les couples qui n'ont aucune parité représentent (23,30%) (Figure 36).

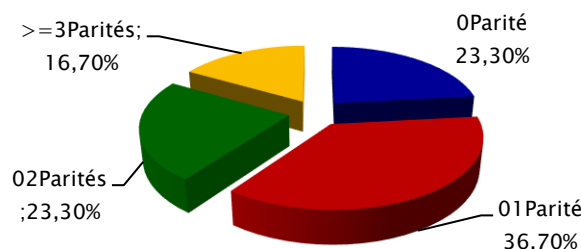


Figure 36: Répartition de l'échantillon selon la parité

Sur les 139 grossesses, 24 grossesses seulement ont pu aboutir à des enfants vivants (EV) (17,27%), et 115 grossesses ont été perdues comme suit (Figure 38) :

- 96 fausses couches;

- 05 MFIU ;
- 03 morts nés ;
- 09 décès néonataux ;
- 01 décès infantile ;
- et 01 grossesse extra utérine (GEU).

La majorité des grossesses sont perdues à un âge gestationnel très précoce (FC).

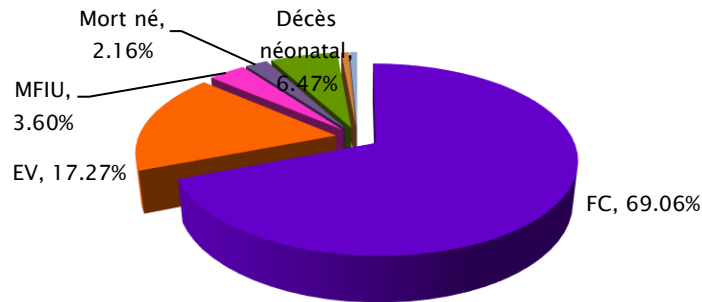


Figure 37: Répartition des grossesses selon leurs issues

Ces résultats témoignent fortement du mauvais résultat obstétrical de ces couples. La moyenne d'enfant vivant par couple est de 0,8 avec un minimum de 0 enfant vivant (0EV) et un maximum de 3 enfants vivants [0-3EV]. Les couples qui n'ont aucun enfant vivant représentent (43,30%), et ceux qui ont eu trois enfants vivants (03EV) représentent 3,30% (Figure 37).

Les accouchements se sont déroulés dans plus de 92% des cas par les voies naturelles (voie basse) et dans les autres cas (8%) par césarienne. 34 accouchements sont des accouchements à terme soit 24,5% et 03 accouchements prématurés soit 2,16% de l'ensemble des grossesses.

16 femmes ont rapporté qu'elles n'ont jamais allaité tandis que les 14 femmes restantes ont allaité pour une durée moyenne de 3mois.

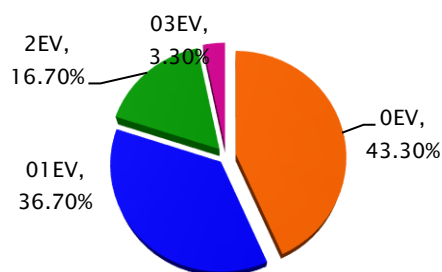


Figure 38: Répartition de l'échantillon selon le nombre d'enfants vivants

Quatre couples ont rapporté avoir eu des bébés malformés :

- Le premier couple, a eu deux bébés avec une malformation cardiaque (communication interventriculaire (CIV)), tous deux ont succombé à leur malformation durant leurs vies néonatales ;

- Le deuxième couple, a eu un bébé avec une malformation abdominale pour laquelle, il a été opéré et a pu survivre (omphalocèle) ;
- Le troisième couple, a eu un nouveau né hydrocéphale, qui a décédé durant sa vie néonatale ;
- Et le quatrième couple a eu un bébé avec un omphalocèle pour lequel il a été opéré, avec des suites simples et une bonne évolution.

Dans 69,1 % des grossesses, les femmes ont eu une menace d'avortement pour laquelle, elles ont été traitées par de la progestérone.

5.4 REPARTITION DES COUPLES EN FONCTION DU NOMBRE ET DE L'AGE GESTATIONNEL DES FCS

Les couples étudiés ont eu au moins deux FCR, réparties comme suit (Figure 39) :

- 46,7% ont eu deux fausses couches à répétition (02FCR) ;
- 23,3% ont eu trois fausses couches à répétition (03FCR) ;
- 20% ont eu quatre fausses couches à répétition (04FCR) ;
- et 10% ont eu cinq fausses couches à répétition et plus ($\geq 05FC$)

Les grossesses qui ont abouti à ces fausses couches sont spontanées dans presque 98% des cas et désirées dans 93,75% des cas. Dans 40,28 % de ces grossesses, les femmes ont été traitées pour une menace d'avortement précoce, et ont dû recevoir un traitement à la progestérone. Elles ont évolué inéluctablement après vers une fausse couche. Leurs terme moyen est de 6,53 SA.

La répartition des fausses couches selon l'âge gestationnel a montré que (Figure 40) :

- 03 fausses couches se sont déroulées en phase préclinique (<6 SA) ;
- 42 fausses couches en phase embryonnaire (6-10SA) ;
- et 51 fausses couches en phase fœtale (10-12SA).

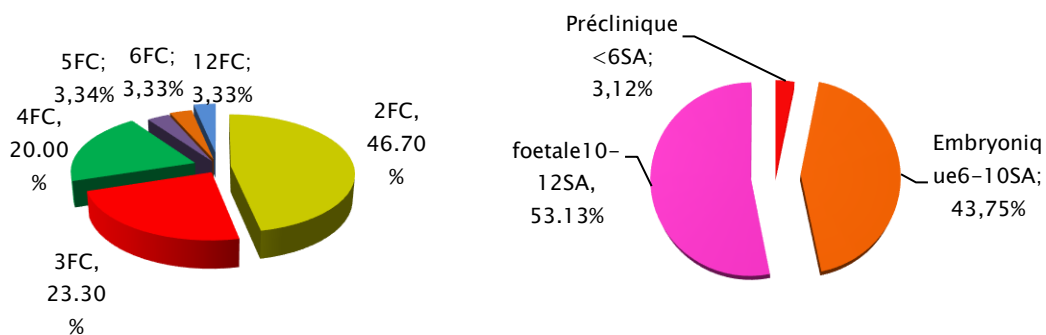


Figure 39: Distribution de l'échantillon selon le nombre de FC

Figure 40: Distribution des FC selon l'âge gestationnel

5.5 ECHOGRAPHIE DU 1^{ER} TRIMESTRE ET FAUSSES COUCHES

L'activité cardiaque a été retrouvée dans 48,92% des cas (68 grossesses) à l'examen échographique du 1^{er} trimestre, signalant l'évolutivité de la grossesse et dont 26 (38,24%) ont évoluées vers des fausses couches.

L'aspect échographique des grossesses qui ont abouti à des fausses couches, est en faveur de:

- grossesses arrêtées dans 32,3% des cas ;

- oeuf clair dans 25% des cas ;
- et il est indéterminé dans 42,7% des cas.

5.6 ORDRE DES GROSSESSES ET FAUSSES COUCHES

Plus de 26% des FCS ont eu lieu à partir de la 5^{ème} grossesse, et 20,83% des FCS se sont déroulées au cours de la deuxième grossesse (Figure 41).

- 1^{ère} grossesse : 17,71%FC ;
- 2^{ème} grossesse : 20,83%FC ;
- 3^{ème} grossesse : 17,71%FC ;
- 4^{ème} grossesse : 17,71%FC ;
- 5^{ème} grossesse: 26,04%FC).

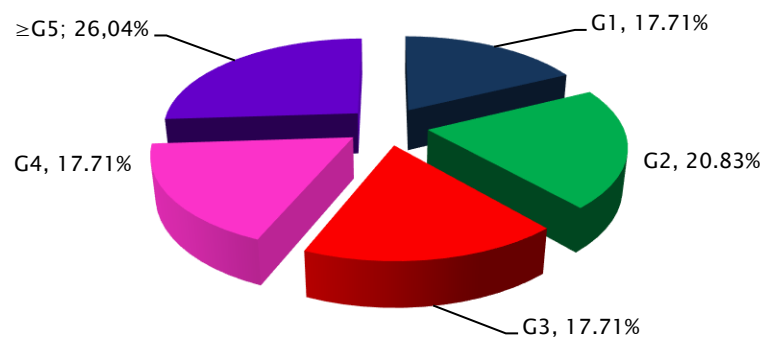


Figure 41: Nombre de fausses couches par rapport à l'ordre des grossesses

5.7 PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES FAUSSES COUCHES

La prise en charge des fausses couches, dans plus de la moitié des cas (56,25%), a consisté en un traitement chirurgical (curetage), avec un moyen de séjour hospitalier de 6,37 jours. Une seule femme a été compliquée par une anémie sévère ; et a été transfusée avant de quitter le milieu hospitalier (Figure 42).



Figure 42: La prise en charge des fausses couches

6 EVOLUTION DES FAUSSES COUCHES EN FONCTION DES PRINCIPAUX PARAMETRES

6.1 NOTION DE CONSANGUINITE

Les couples n'ayant aucun lien de consanguinité sont ceux qui ont fait plus d'accidents abortifs (89,58%) (Figure 43).

6.2 AGE A LA MENARCHE ET AGE PARENTAL

Les femmes qui ont eu leur ménarche à un âge tardif [12-15 ans] sont les femmes qui ont fait plus de fausses couches (Figure 44).

D'après la figure 45 les femmes les plus âgées, sont les femmes qui ont fait plus de fausses couches. De même le nombre de fausses couches augmente avec l'âge paternel [23-44 ans] pour diminuer après vers l'âge de [45-52] (Figure 46).

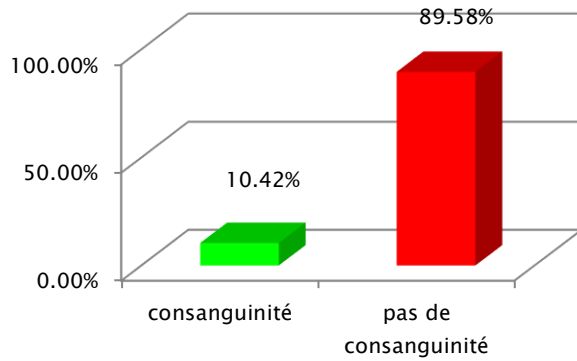


Figure 43: Consanguinité et fausse couche

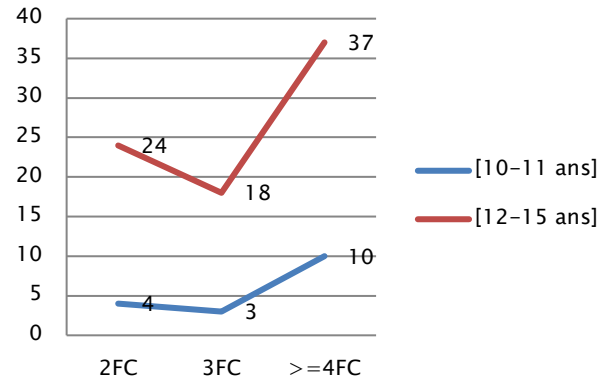


Figure 44: Age à la ménarche et fausse couche

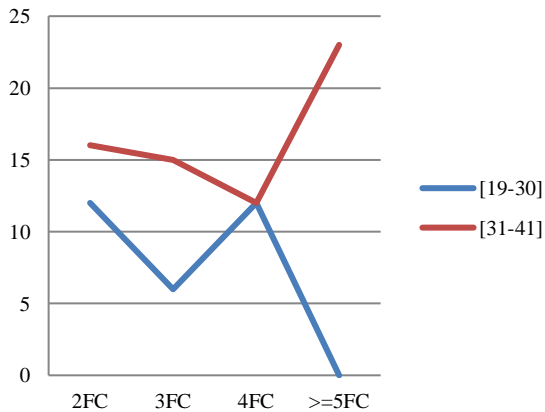


Figure 45: Age maternel et fausse couche

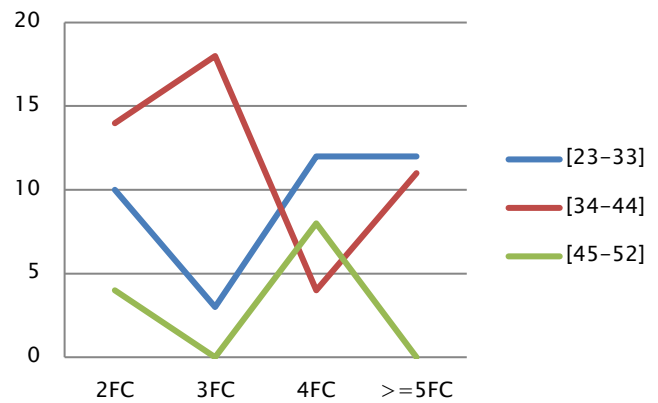


Figure 46: Age paternel et fausse couche

6.3 GESTITE ET PARITE

Les figures (47,48) montrent que le nombre de fausse couche augmente avec la gestité de la femme, plus la femme fait des grossesses plus elle est à risque de refaire une fausse couche. Il ressort aussi de ces résultats que la répétition des accidents abortifs est l'apanage des femmes nullipares.

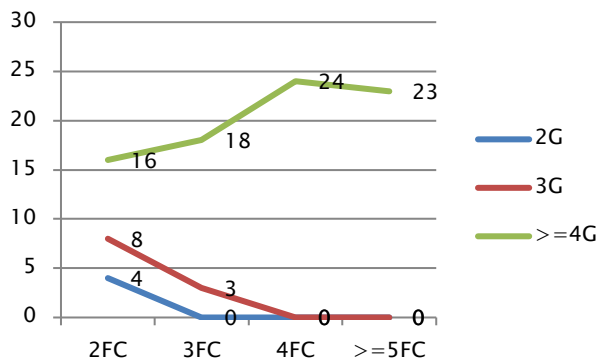


Figure 47: Gestité des couples et fausse couche

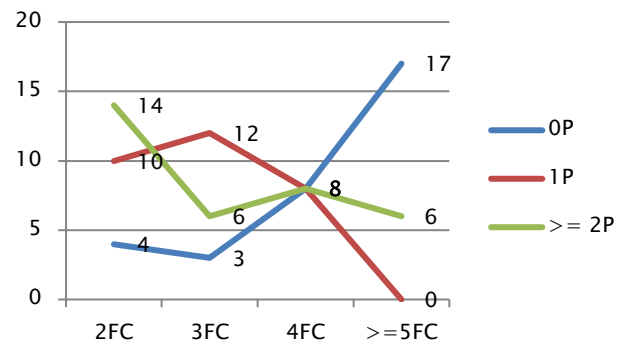


Figure 48: Parité des couple et fausse couche

6.4 GROSSESSES PERDUES EN PERIODE PERINATALE ET ENFANTS VIVANTS

Les couples qui ont fait plus de fausses couches sont ceux qui ont fait plus d'accident obstétricaux durant la période périnatale (MFIU, morts nés, décès néonataux) (Figure 49).

Les couples qui ont le taux de fausses couches le plus élevé, sont ceux qui ont le taux le plus faible d'enfants vivants (Figure 50).

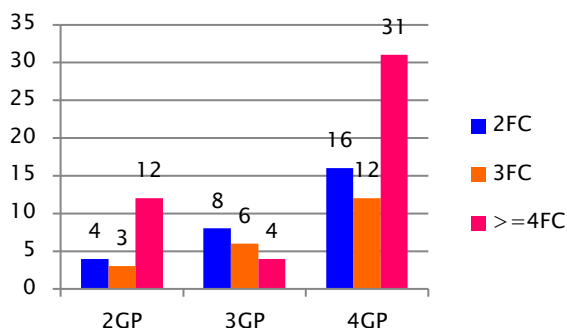


Figure 49: Grossesses perdues en périnatale et FC

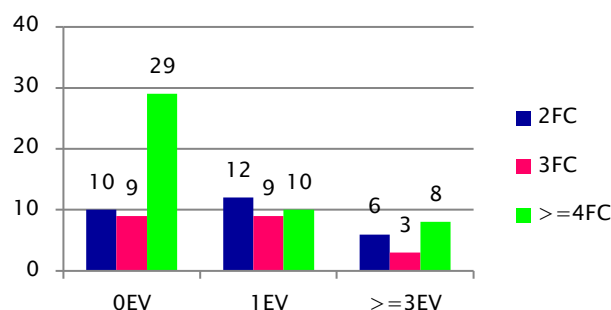


Figure 50: Nombre d'enfants vivants et fausses couches

6.5 AGE GESTATIONNEL

La plupart des accidents abortifs ont eu lieu principalement à un stade de développement précoce [6-9 SA] (Figure 51).

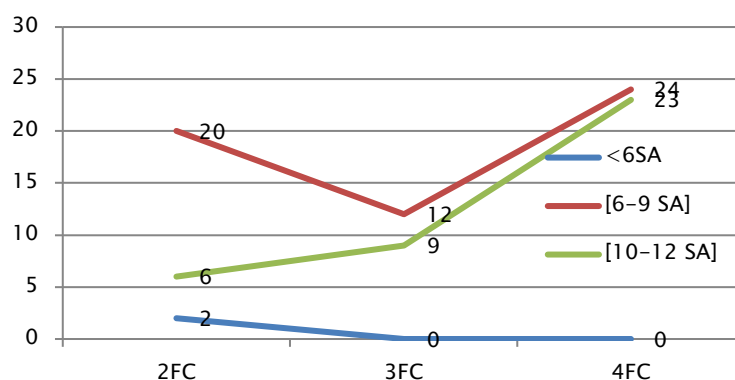


Figure 50: Age gestationnel et fausse couche

7 RETENTISSEMENT PSYCHO-SOCIALE

Tous les couples sujets de l'étude ont rapporté, que ce problème d'avortement à répétition dont ils souffrent a retentit sur leur vie psychologique et sociale. Les femmes s'avèrent les plus touchées par rapport à leurs partenaires (Tableau 10).

Tableau 6: Retentissement psychologique et sociale

Trouble psychologique	% Femmes	% Hommes
- Dépression	66,67%	16,67%
- Anxiété	96,67%	50%
- Trouble sommeil	83,34%	10%
- Conflit conjugale	93,33%	80%

ETUDE ANALYTIQUE ET COMPARATIVE

1 INTRODUCTION

Dans cette partie nous étudions les variables qui affectent l'issue de la grossesse, puis le lien entre le nombre de fausses couches et les paramètres étudiés. Par la suite nous présentons les principaux résultats des tests cytogénétiques réalisés. Ces résultats (IP, MN, IS, IM, AC, IR et ECS) en comparaison avec la moyenne des témoins, seront représentés sous forme de présentations graphiques et de tableaux.

2 EVOLUTION DE L'ISSUE DES GROSSESSES ET DU NOMBRE DE FAUSSES COUCHES

Nous avons comparé les variables étudiés (âge maternel, délai protogénésique, délai intergénéésique, âge à la ménarche ; âge à la première grossesse, durée de mariage, indice de masse corporelle « IMC », délai entre l'arrêt de la contraception orale et la grossesse) et l'aboutissement de la grossesse (fausse couche/accouchement) pour mieux comprendre les liens existant, comme le montre le tableau 11. Les résultats montrent qu'il y a une différence significative ($p < 0,05$) entre l'issue de la grossesse (accouchement/FC) et :

- l'indice de masse corporelle (IMC) ;
- le délai entre l'arrêt de la CO et le fait de tomber enceinte.

Tableau 11 7: Résultats du Test t Student de comparaison de moyenne de chaque paramètre à l'issue de grossesse

Paramètre	Issue de la grossesse	N	Moyenne	Ecart-type	t / score z	p-value
Age maternel/mois	Accouchement	43	318,98	64,499	-,136	0,892
	Fausse couche	96	320,67	68,790		
Délai protogénésique	Accouchement	43	5,00	5,228	-0,576	0,564
	Fausse couche	96	5,16	4,756		
Délai intergénéésique	Accouchement	43	8,79	10,754	-0,702	0,483
	Fausse couche	96	7,95	14,437		
Age à la Ménarche	Accouchement	43	25,53	4,537	-0,988	0,323
	Fausse couche	96	24,35	5,493		
Age à la 1ère grossesse	Accouchement	43	25,37	4,806	0,463	0,645
	Fausse couche	96	24,94	5,754		
Age à la 1ère fausse couche	Accouchement	43	26,35	4,603	0,781	0,437
	Fausse couche	96	25,64	5,727		
Durée mariage	Accouchement	43	6,12	3,282	-0,978	0,328
	Fausse couche	96	5,47	2,894		
Indice de masse corporelle (IMC)	Accouchement	43	26,49	2,462	2,152	0,033
	Fausse couche	96	27,44	2,292		
Délai entre arrêt de la contraception et grossesse	Accouchement	43	2,35	1,462	-2,078	0,038
	Fausse couche	96	1,82	1,444		

Les 30 couples de l'étude ont eu 139 grossesses au total. Le tableau 12 résume les résultats, qui montrent que plusieurs variables (le traitement reçu pendant le 1^{er} trimestre de grossesse, l'activité cardiaque, la prise de contraception orale avant la FC, les antécédents pathologiques des couples, la consommation de l'eau de puits, et celle de l'eau de source) sont statistiquement liés au nombre de fausses couches classé en quatre groupes (2FC, 3FC, 4FC, 5FC et plus). On note qu'il y a une différence significative entre à la fois le nombre de fausses couches et (Tableau 12):

- Le traitement reçu pendant le 1^{er} trimestre de grossesse (la progestérone) ;
- L'activité cardiaque à l'échographie du 1^{er} trimestre;
- La prise de contraception orale avant la fausse couche ;
- Et la consommation de l'eau de source.

On remarque également qu'il y a une différence proche de la significativité entre le nombre de FC et :

- les antécédents pathologiques des couples ;
- et la consommation de l'eau de puits (souterraine).

Tableau 8: étude du nombre de FCS en fonction des principaux paramètres

	Traitement	Activité cardiaque	CO avant FC	ATCDS Path	Eau de puits	Eau source
H de Krauskal-Wallis	18,276	16,060	10,852	6,891	7,231	8,286
ddl	3	3	3	3	3	3
P	0,000	0,001	0,013	0,075	0,065	0,040

3 ANALYSE DES DONNEES DES TESTS CYTOGENETIQUES

3.1 TEST DE MICRONOYAUX (MN) DES COUPLES

3.1.1 Indice de prolifération (IP)

La figure 52 représente les résultats de l'indice de prolifération cellulaire de chaque membre (homme+femme) des couples étudiés en comparaison à la moyenne des témoins (1,59±0,00). On remarque que toutes les valeurs de notre échantillon sont plus basses que la moyenne des témoins.

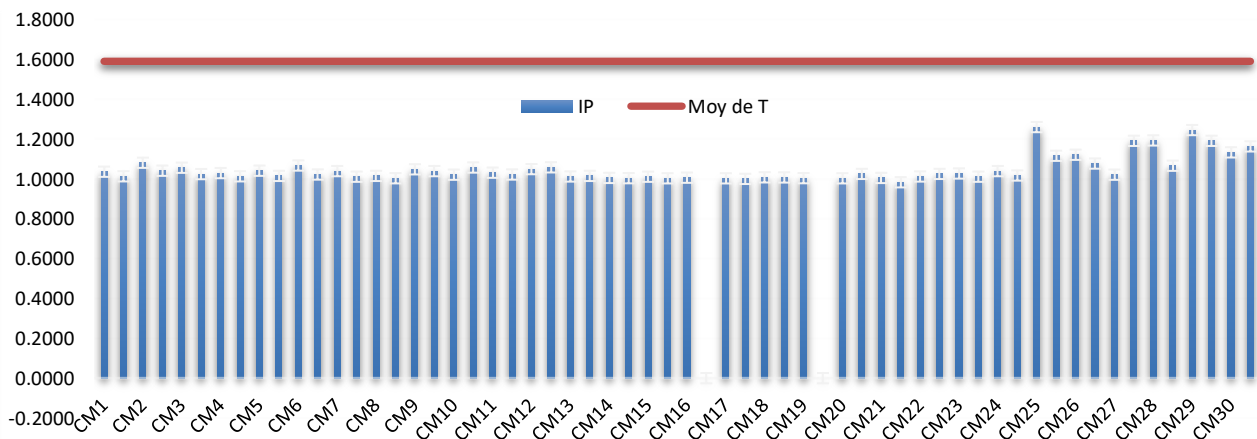


Figure 51: Variation de l'IP de chaque couple en comparaison à la moyenne des témoins

La comparaison de la moyenne de notre échantillon (1,0138±0,0257) à celle des témoins a montré une différence très hautement significative (P<0.001). La valeur du t de Student est de (-22,350), pour une moyenne de différences de (-0,5761) (Tableau 14).

3.1.2 Fréquence des Micronoyaux

La figure 53 représente les résultats de la fréquence des micronoyaux de chaque individu en comparaison avec la moyenne des témoins (0,0033±0,0000). Ainsi, nous constatons que la majorité écrasante des couples présentent une fréquence des Micronoyaux (Mn) plus élevée (0,0048±0,0003) que la moyenne des témoins. La comparaison de la moyenne de notre échantillon avec celle des témoins a montré une

différence très hautement significative ($P < 0.001$). La valeur du t de Student est de (4,716) pour une moyenne de différences de (0,0015) (Tableau 14).

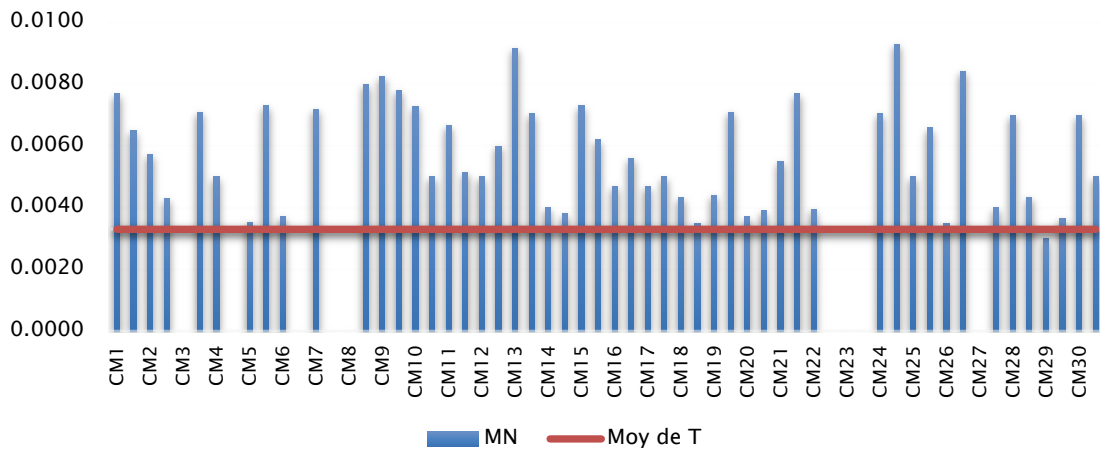


Figure 52: Variation de la fréquence des MNX de chaque couple en comparaison à la moyenne des témoins

3.2 TEST DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES (AC)

3.2.1 Indice de stimulation (IS)

La figure 54 représente les résultats de l'indice de stimulation (IS) de chaque individu en comparaison avec la moyenne des témoins ($0,36 \pm 0,00$). Nous constatons que la majorité des couples présentent un IS plus grand ($0,4647 \pm 0,0131$) que la moyenne des témoins.

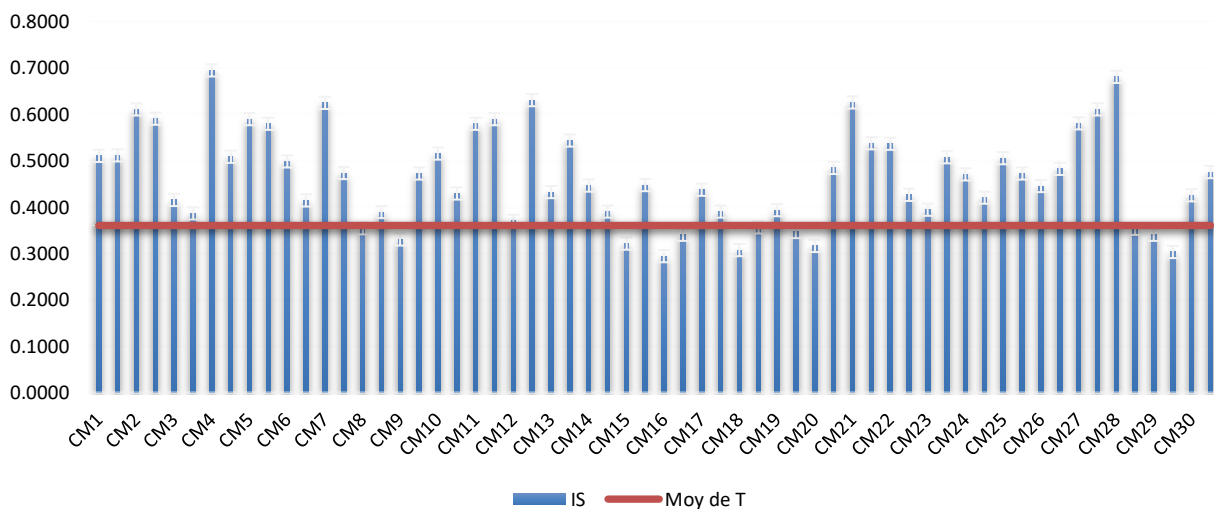


Figure 53: Variation de l'IS de chaque couple en comparaison à la moyenne des témoins

La comparaison de la moyenne de notre échantillon avec celle des témoins a montré une différence très hautement significative ($P < 0.001$). La valeur du t Student est de (7,945) pour une moyenne de différences de (0,1047) (Tableau 14).

3.2.2 Indice Mitotique (IM)

La figure 55 représente les résultats de l'indice mitotique (IM) des couples en comparaison avec la moyenne des témoins ($0,08 \pm 0,0000$). La majorité des couples présente un IM plus faible ($0,0379 \pm 0,0044$) que la moyenne des témoins. La comparaison de la moyenne de notre échantillon avec celle du témoin a

montré une différence très hautement significative ($P < 0.001$). La valeur du t de Student est de (-9,531) pour une moyenne de différences de (-0,0420) (Tableau 14).

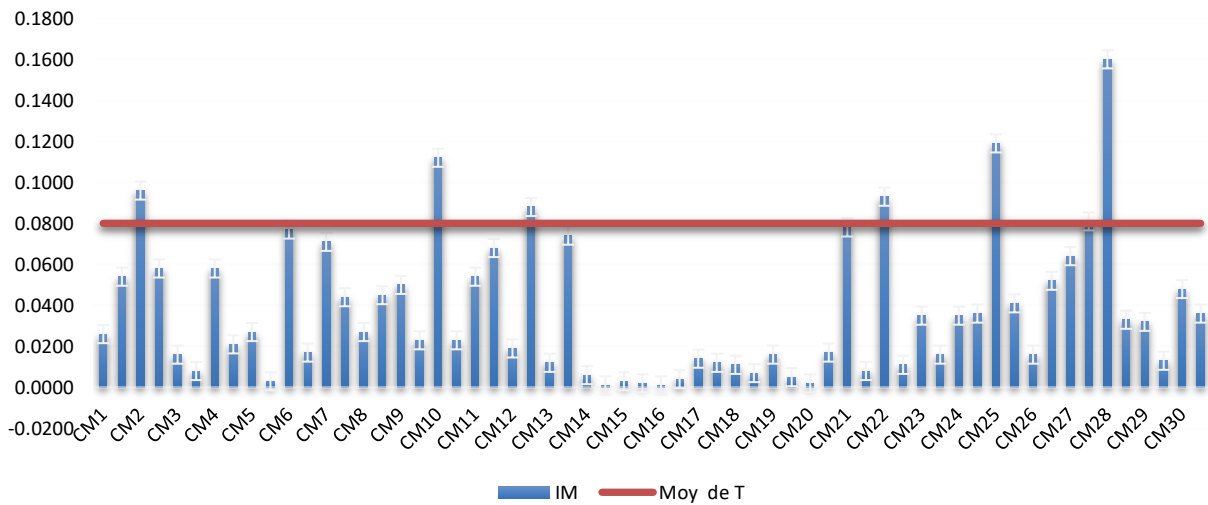


Figure 54: Variation de l'IM des couples en comparaison à la moyenne des témoins

3.2.3 Taux des aberrations chromosomiques

16 couples sur 30 (53,34%) ont une aberration chromosomique (AC). La figure 56 représente les résultats du taux des aberrations chromosomique des couples comparés à la moyenne des témoins ($0,0033 \pm 0,0000$). On note que 18/60 (30%) des patients étudiés présentent un taux des aberrations chromosomique plus élevé ($0,0066 \pm 0,0016$) que la moyenne des témoins. Dix femmes et huit hommes ont des anomalies chromosomiques, avec un rapport de 1,25.

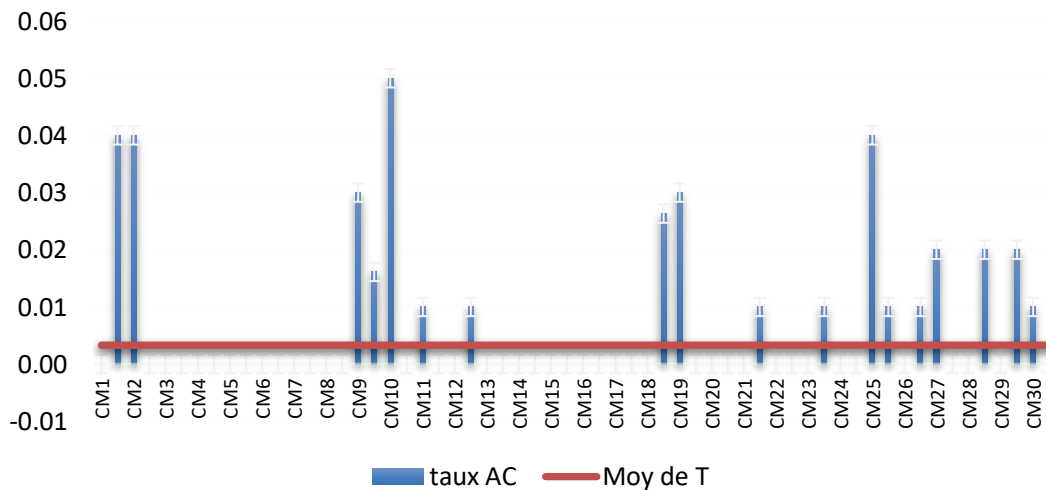


Figure 55: Variation des taux des AC des couples en comparaison à la moyenne des témoins

La comparaison de la valeur moyenne de notre échantillon à la valeur moyenne des témoins a montré une différence significative ($P < 0.05$). La valeur du t de Student est de (2,022) pour une moyenne de différences de (0,0033) (Tableau 14).

La figure 57 illustre que l'AC la plus fréquente est à type de fragments (Frag). Elle est retrouvée dans presque 37% des cas, suivie par les lacunes (Lac) dans 24% des cas, les cassures extrêmes (CE) dans 13% des cas. La cassure chromosomique (CS) et la Polypléidie en mosaïque (PolyP) représentent 8% des cas

chacune, la cassure chromatidique (CT) et le chromosome dicentrique (C dic) dans 5% des cas chacun (Figures 58 et 59).

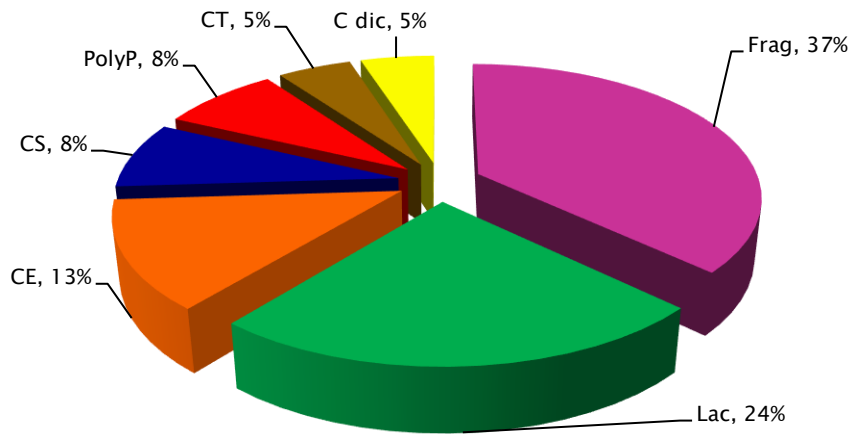


Figure 56: Les différentes anomalies chromosomiques des couples

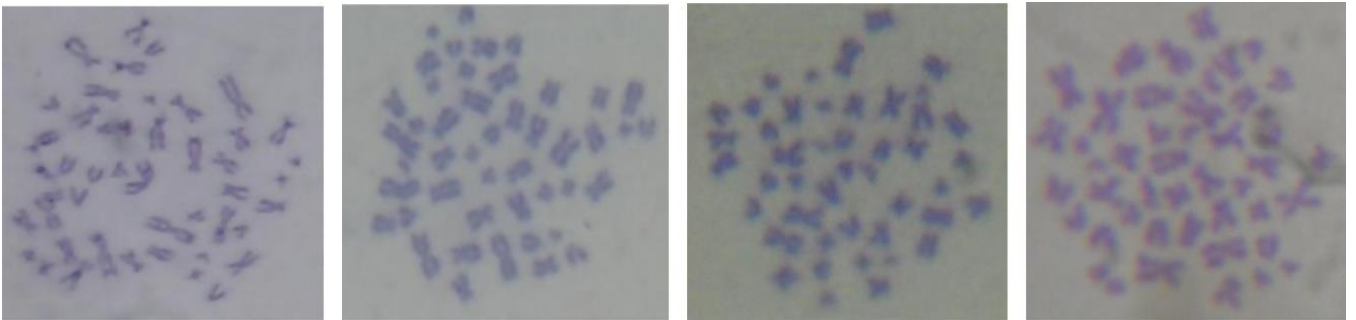
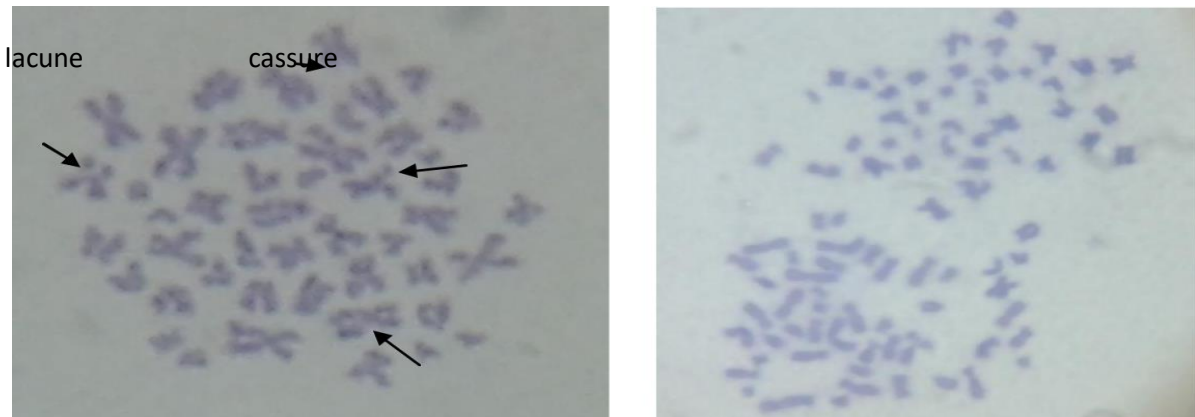


Figure 57: Métaphase normales observées sous microscope pour le test des Aberrations chromosomiques (Gx100)



a

b

Figure 58: Métaphases observées sous microscope montrant des anomalies chromosomiques: cassure, fragment, lacune (a) et polypléidie (b), (Gx1000)

53,34% des couples souffrant de FCR ont une AC. 25% des couples porteurs d'AC ont eu au moins deux accidents abortifs successifs avant de réussir une grossesse et 31,25% ont perdu toutes leurs grossesses sous forme de FC. Tandis que 50% des couples non porteurs ont réussi leur première grossesse, 21,42% ont eu deux FC successives durant leurs deux premières grossesses, de même 14,28% seulement ont perdu toutes leurs grossesses sous forme de FC (Tableau 13).

Six (06) couples ont eu des enfants phénotypiquement normaux (20%), avant leurs échecs de procréation. La fréquence des aberrations chromosomiques de ces couples est de 50% (soit 3/6).

Tableau9: Aberrations chromosomiques et fausses couches

AC \ Les GP	Nbre FC	Perte de la totalité des grossesses (FC)	pertes des deux premières grossesses (FC)
Les couples porteurs d'AC	57,30 %	31,25%	25%
Les couples non porteurs d'AC	42,7 %	14,28%	21,42%

3.3 TEST DES ECHANGES ENTRE LES CHROMATIDES SŒURS(ECS)

3.3.1 Taux des échanges entre les chromatides sœurs

La figure 60 représente les résultats des échanges entre les chromatides sœurs (ECS) de l'échantillon étudié comparés à la moyenne des témoins ($1,46 \pm 0,00$). Les résultats montrent que la majorité des individus ont une valeur supérieure ($1,8567 \pm 0,1742$) à celle des témoins (Figure 60,61). La comparaison de la moyenne de notre échantillon avec celle des témoins a montré une différence très hautement significative ($P < 0.001$). La valeur du t de Student est de (-16,893) pour une moyenne de différences de (-2,9432) (Tableau 14).

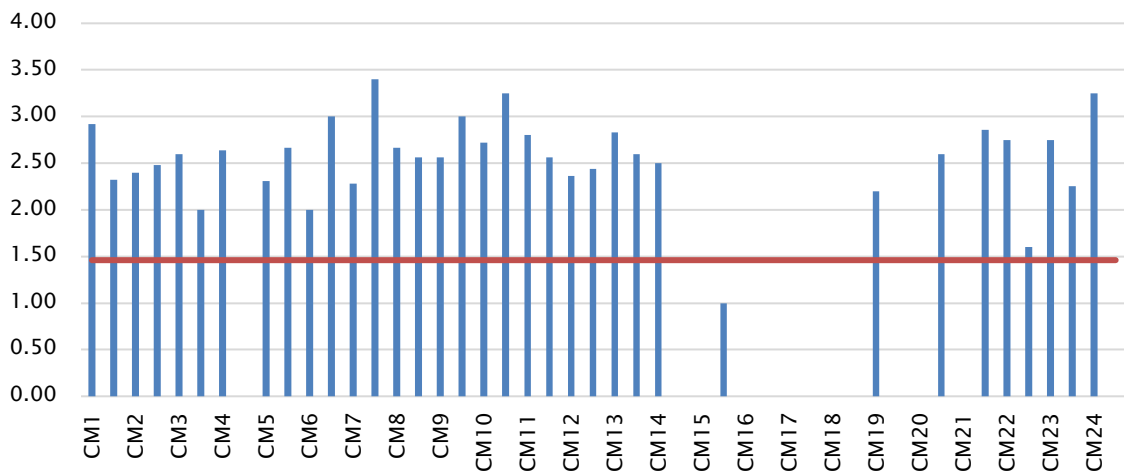


Figure 59: Variation des taux des échanges entre les chromatides soeurs en comparaison à la moyenne des témoins

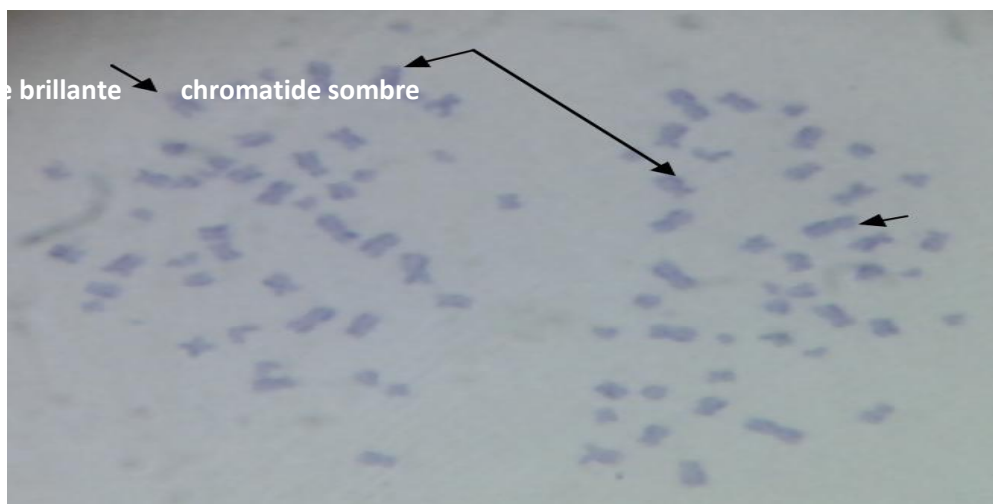


Figure 60: Métaphase observées sous microscope en deuxième division cellulaire avec anomalie chromosomique (polyploïdie) analysée par le test d'ECS (Gx1000)

3.3.2 Indice de Réplication (IR)

La figure 62 montre les valeurs de l'indice de réplication des couples et la valeur moyenne de l'IR des témoins. Tout les sujets étudiés ont un indice de réplication beaucoup moins ($1,2291 \pm 0,0826$) que la moyenne des témoins ($2,33 \pm 0,0000$). La comparaison de la moyenne de l'échantillon avec celle de la moyenne des témoins a montré une différence très hautement significative ($P < 0.001$). La valeur du t de Student est de (-13,322) pour une moyenne de différences de (-1,1008) (Tableau 14).

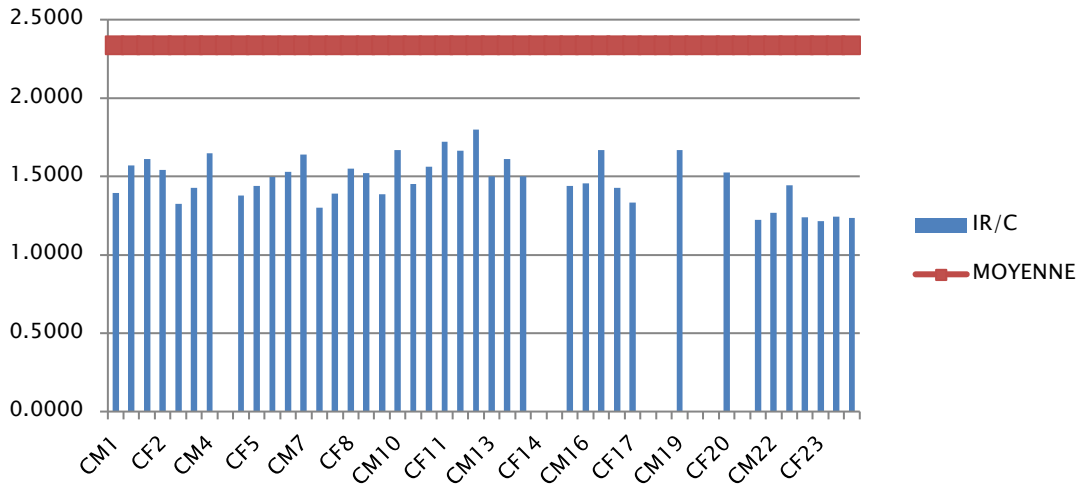


Figure 61: Variation de l'IR des couples en comparaison à la moyenne des témoins

La comparaison des résultats obtenus avec ceux des témoins a montré des différences significatives pour tous les indicateurs. Elles sont même très hautement significative ($p < 0,001$) pour IP, Mn, IM, IS, ECS, IR et significative pour les AC ($p < 0,05$). Ainsi l'augmentation de la fréquence des Micronoyaux, des taux des aberrations chromosomiques (AC), et des échanges entre les chromatides sœurs (ECS) suggère le degré de dommages et de l'instabilité chromosomique dans les lymphocytes du sang périphérique chez ces couples souffrant de fausses couches à répétition et du mauvais résultat reproductif. Ces résultats reflètent les perturbations de leurs cycles cellulaires, les indices : IP, IM et IR sont faibles avec un IS plus élevé en comparant aux témoins.

Tableau 10: Comparaison des moyennes des différents biomarqueurs à celles des témoins

Moyennes Bio- marqueurs	Moyenne de différence	Moyenne	Erreur standard	t	P valeur	Interprétation
Indice prolifération (IP)	-0,5761	1,0138	0,0257	-22,350	0,000	***
Micronoyaux (MN)	0,0015	0,0048	0,0003	4,716	0,000	***
Indice stimulation (IS)	0,1047	0,4647	0,1318	7,945	0,000	***
Indice mitotique (IM)	-0,0420	0,0379	0,0044	-9,531	0,000	***
Aberration chromosomique (AC)	0,0033	0,0066	0,0016	2,022	0,048	*
Echanges chromatides sœurs (ECS)	-2,9432	1,8567	0,1742	-16,893	0,000	***
Indice réplication (IR)	-1,1008	1,2291	0,0826	-13,322	0,000	***

significatif ; * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$ et NS : non significatif

4 EVOLUTION DES INDICATEURS DE GENOTOXICITE EN FONCTION DES PRINCIPALES VARIABLES

Dans cette partie nous procéderons à l'étude des indicateurs de génotoxicité mesurés (IP, MN, IS, IM, AC, ECS et l'IR) en fonction des principales variables pour mieux expliquer les différences observées au sein

del'échantillon étudié. Les variables les plus importantes et auxquelles nous nous sommes intéressés sont : le sexe, l'âge parental, la gestité, la parité, le nombre de fausses couches, le nombre d'enfants vivants, et le nombre de grossesses perdues en période périnatale.

4.1 EVOLUTION DES INDICATEURS DE GENOTOXICITE EN FONCTION DU SEXE

4.1.1 Indice de prolifération (IP)

La figure 63 montre que la valeur moyenne de l'indice de prolifération chez les hommes ($1,0540 \pm 0,0126$) est plus élevée que celle des femmes ($0,9737 \pm 0,0493$). La comparaison de la moyenne de l'IP des deux sexes à la moyenne des témoins a montré une différence très hautement significative ($P < 0.001$) pour les deux (Tableau 15).

4.1.2 Fréquence des micronoyaux

La figure 64 représente la valeur moyenne de la fréquence des Micronoyaux des femmes ($0,0049 \pm 0,0005$) et des hommes ($0,0048 \pm 0,0004$). Nous constatons que la fréquence des MN des femmes est supérieure à celle des hommes. La comparaison de la moyenne de notre échantillon à celle des témoins a montré une différence très significative ($P < 0.01$) pour les deux sexes (Tableau 15).

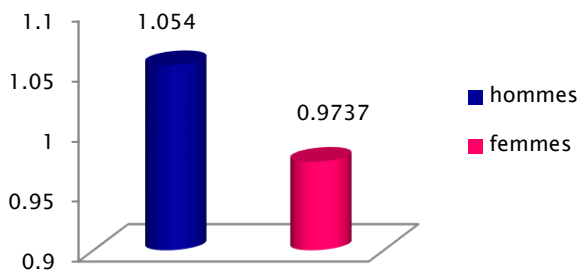


Figure 62: Valeur moyenne de l'IP en fonction du sexe

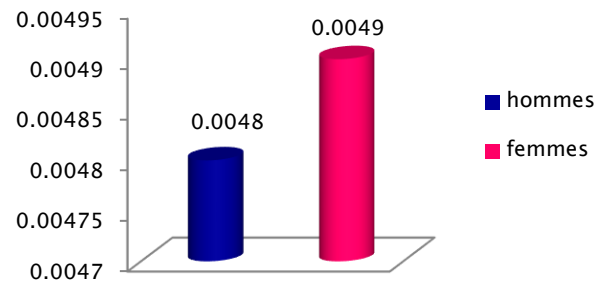


Figure 63: Valeur moyenne des MNX en fonction du sexe

4.1.3 Indice de stimulation (IS) et Indice mitotique (IM)

D'après les deux figures 65 et 66, nous constatons que les valeurs moyennes de l'indice de stimulation (IS) et l'indice mitotique (IM) enregistrées chez les hommes [IS ($0,4678 \pm 0,0212$)] ; [IM ($0,0459 \pm 0,0072$)] sont plus élevées que celles des femmes [IS ($0,04617 \pm 0,0046$)] ; [IM ($0,03 \pm 0,0046$)]. Pour les deux indices (IS+IM), la comparaison de leurs moyennes respectives à celle des témoins a montré une différence très hautement significative ($P < 0.001$) pour les deux sexes (Tableau 15).

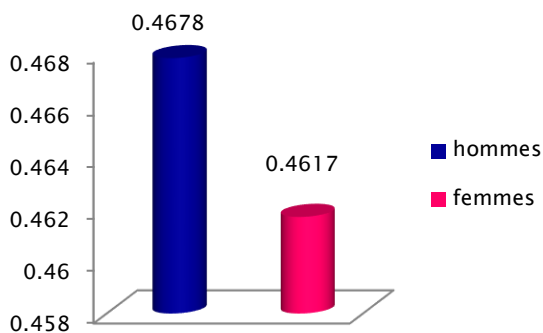


Figure 64: Valeur moyenne de l'IS des deux sexes

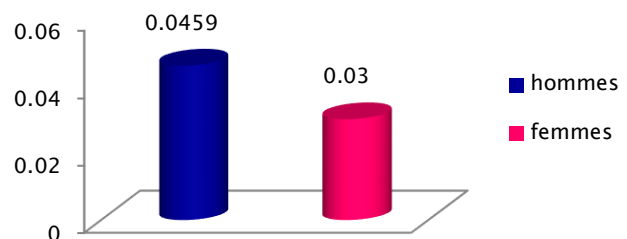


Figure 65: Valeur moyenne de l'IM des deux sexes

4.1.4 Taux des aberrations chromosomiques

Dix femmes sur huit hommes (1,25), ont présenté une aberration chromosomique. La moyenne du taux des aberrations chromosomiques des femmes ($0,0077 \pm 0,0025$) est plus élevée que la moyenne du taux des aberrations chromosomiques des hommes ($0,0059 \pm 0,0018$) (Figure 67). La comparaison de la moyenne de notre échantillon avec celle des témoins n'a pas montré de différence significative ($p > 0,05$) pour les deux sexes (Tableau 15).

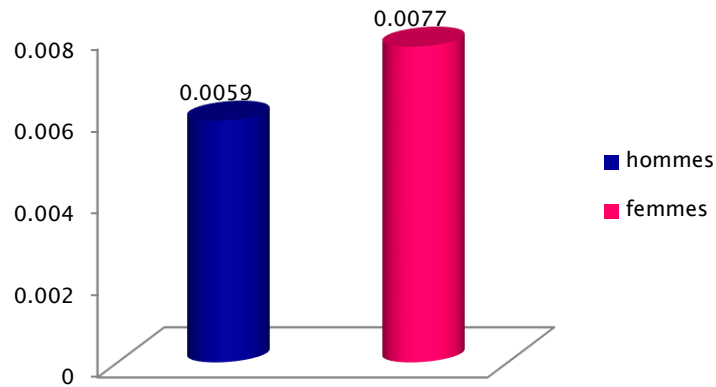


Figure 66: Valeur moyenne des AC des deux sexes

4.1.5 Indice de Réplication

La moyenne de l'indice de réplication des hommes ($1,2330 \pm 0,1180$) est supérieure à celle des femmes ($1,2254 \pm 0,1181$) (Figure 68). La comparaison de la moyenne de l'IR des deux sexes à celle des témoins ($2,33 \pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$) pour les deux sexes (Tableau 15).

4.1.6 Taux des échanges entre les chromatides sœurs

La moyenne des taux des échanges entre les chromatides sœurs des femmes ($1,94 \pm 0,2391$) est supérieure à celle des hommes ($1,77 \pm 0,2574$) (Figure 69). La comparaison de la moyenne du taux des ECS des deux sexes à celle des témoins a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$) pour les deux sexes (Tableau 15).

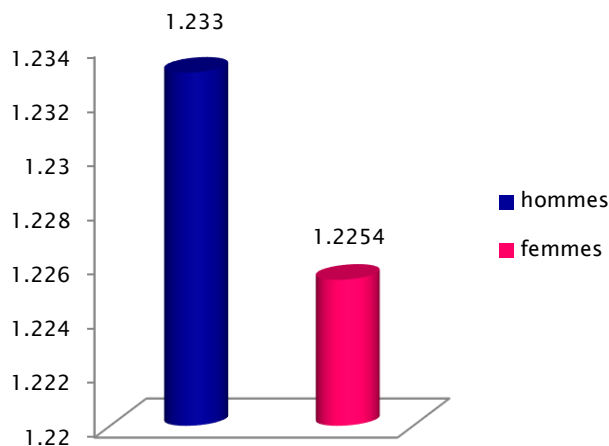


Figure 67: Valeur moyenne de l'IR des deux sexes

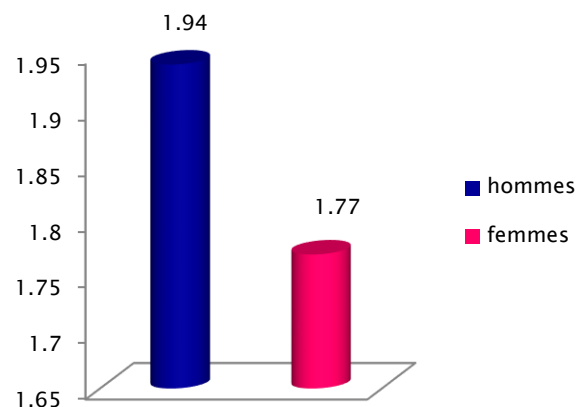


Figure 68: Valeur moyenne des ECS des deux sexes

Les femmes paraissent avoir plus dommages chromosomiques dans leurs lymphocytes par rapport aux hommes. Les femmes ont une fréquence de Micronoyaux ($p < 0,01$) et un taux des ECS plus élevés ($p < 0,001$) et des indices (IP, IM, IS et IR) plus faibles par rapport aux hommes.

Tableau 11 : Résultats statistiques des indicateurs de génotoxicité en fonction du sexe

		N	Différence moyenne	Moyenne	Erreur std	t	P valeur	Interprétations
IP	hommes	30	-0,5360	1,0540	0,0126	-42,417	0,0000	***
	femmes	30	-,61627	0,9737	0,0493	-12,494	0,0000	***
MN	hommes	30	0,0015	0,0048	0,0004	3,311	0,002	**
	femmes	30	0,0016	0,0049	0,0005	3,309	0,003	**
IS	hommes	30	0,1078	0,4678	0,0212	5,069	0,0000	***
	femmes	30	0,1017	0,4617	0,0046	6,376	0,0000	***
IM	hommes	30	-0,0340	0,0459	0,0072	-4,667	0,0000	***
	femmes	30	-0,0500	0,0300	0,0046	-10,792	0,0000	***
AC	hommes	30	0,0025	0,0055	0,0018	1,378	0,179	NS
	femmes	30	0,0043	0,0077	0,0026	1,618	0,116	NS
IR	hommes	30	-1,0970	1,2330	0,1180	-9,290	0,000	***
	femmes	30	-1,1046	1,2253	0,1181	-9,350	0,000	***
ECS	femmes	30	-2,8609	1,9400	0,2391	-11,961	0,000	***
	hommes	30	-3,0255	1,7700	0,2574	-11,753	0,000	***

significatif ; * : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$ et NS : non significatif

4.2 EVOLUTION DES INDICATEURS DE GENOTOXICITE EN FONCTION DE L'AGE MATERNEL

4.2.1 Indice de prolifération (IP)

Nous avons classé les femmes selon leurs âges en deux classes : La première classe a un âge compris entre [19-30ans] et la deuxième classe a un âge compris entre [31-41ans]. La moyenne de l'indice de prolifération de la première classe est de $(0,9223 \pm 0,0798)$, elle est plus basse que celle de la deuxième classe [31-41ans] $(1,0508 \pm 0,1926)$ (Figure 70). La comparaison de la moyenne des deux classes à celle des témoins $(1,59 \pm 0,0000)$ a montré une différence très hautement significative pour les deux classes d'âge ($P < 0,001$) (Tableau 16).

4.2.2 Fréquence des micronoyaux (MNX)

La classe d'âge la plus jeune [19-30ans] a une valeur moyenne de la fréquence des Micronoyaux $(0,0057 \pm 0,0004)$ plus élevée que la classe la plus âgée [31-41 ans] $(0,0042 \pm 0,0033)$ (Figure 71). En comparant la moyenne de la fréquence des Micronoyaux de la classe d'âge la plus jeune [19-30 ans] à celle des témoins qui est de $(0,0033 \pm 0,0000)$, on a trouvé une différence très hautement significative ($P < 0,001$). La valeur du t student est de $(5,710)$ pour une moyenne de différence de $(-0,0024)$. Tandis que la comparaison de la moyenne de la fréquence des Micronoyaux de la deuxième classe [31-41ans], qui est la plus âgée à celle des témoins $(0,0033 \pm 0,0000)$, n'a pas trouvé de différence significative ($P > 0,05$). La valeur du t student est de $(0,986)$ pour une moyenne de différence de $(-0,0010)$ (Tableau 16).

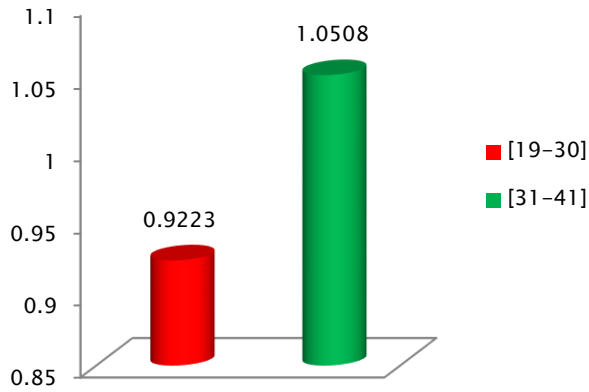


Figure 69: Valeur moyenne de l'IP et âge maternel

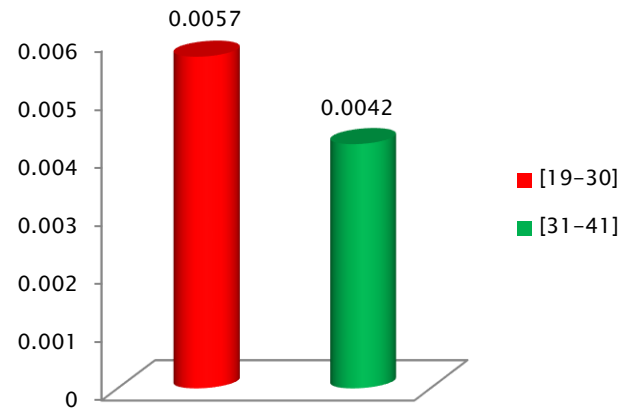


Figure 70: Valeur moyenne de la fréquence MN et âge maternel

4.2.3 Indice de Stimulation (IS)

La moyenne de l'indice de stimulation de la classe d'âge [19-30ans] est plus élevée que celle de la classe d'âge [31-41ans], elle est respectivement de $(0,4651 \pm 0,0228)$ et $(0,4594 \pm 0,0223)$ (Figure 72). La moyenne de chacune des deux classes comparée à celle des témoins qui est de $(0,36 \pm 0,00)$, a montré une différence très significative ($p < 0,001$) pour la première classe [19-30ans] qui est la plus jeune. La valeur de t student est de $(4,459)$ pour une moyenne de différence de $(0,0994)$. Cette différence est très hautement significative pour la deuxième classe [31-41ans] ($p < 0,01$), avec une valeur de t student de $(4,599)$ pour une moyenne de différence de $(0,1050)$ (Tableau 16).

4.2.4 Indice Mitotique (IM)

Les résultats ont trouvé que la moyenne de l'indice mitotique de la classe d'âge [31-41ans] $(0,0319 \pm 0,0076)$ est supérieure à celle de la classe d'âge [19-30ans] $(0,0288 \pm 0,0059)$ (Figure 73). La comparaison de la moyenne de l'indice mitotique des deux classes d'âge maternel à la moyenne des témoins qui est de $(0,08 \pm 0,00)$ a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$), pour les deux classes d'âge maternel (Tableau 16).

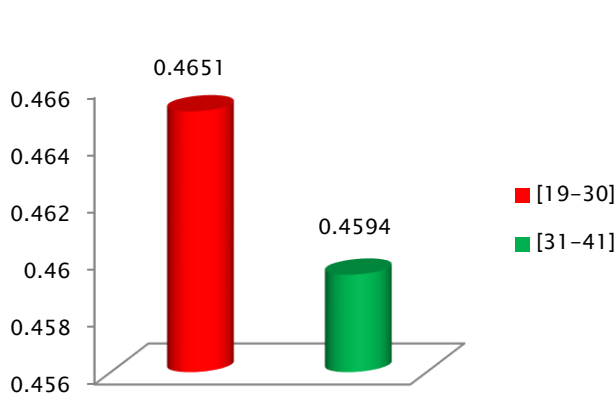


Figure 71: Valeur moyenne de l'IS et âge maternel

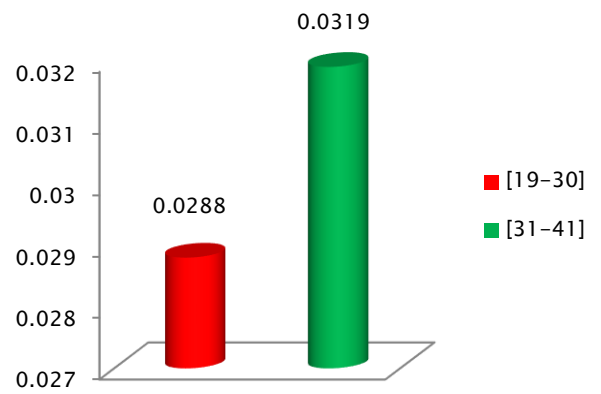


Figure 72: Valeur moyenne de l'IM et âge maternel

4.2.5 Taux des aberrations chromosomiques

La moyenne du taux des aberrations chromosomiques de la classe jeune [19-30 ans], $(0,008 \pm 0,0039)$ est plus supérieure par rapport à la classe la plus âgée $(0,0044 \pm 0,0016)$ (Figure 74). La comparaison de la

moyenne des deux classes d'âge à celle des témoins (0,0033±0,00) n'a pas montré de différence significative pour les deux classes ($p>0,05$) (Tableau 16).

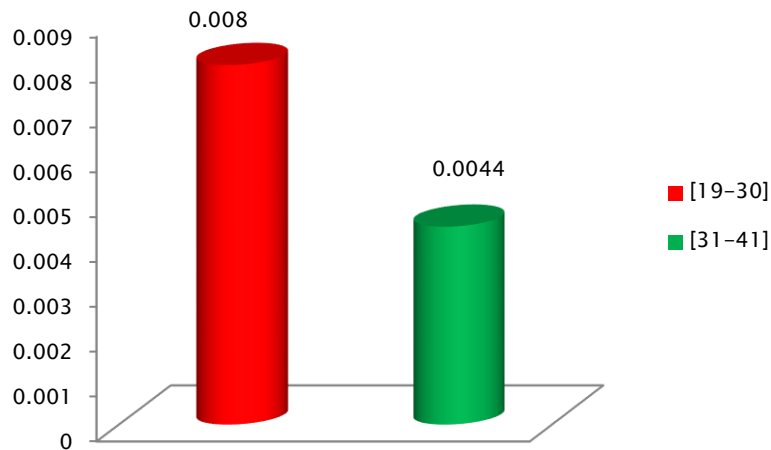


Figure 73: Valeur moyenne des AC des deux classes d'âge maternel

4.2.6 Indice de Réplication

La moyenne de l'indice de réplication pour la classe d'âge [19-30 ans] (1,1797±0,2253) est inférieure à celle de la classe d'âge [31-41 ans] (1,2526± 0,1383) (Figure 75). La comparaison de la moyenne de l'IR de chacune des deux classes d'âge à celle des témoins (2,33±0,00) a montré une différence très hautement significative ($p<0,001$) pour les deux classes (Tableau 16).

4.2.7 Echanges entre les chromatides sœurs

La moyenne des taux des échanges entre les chromatides sœurs de la classe d'âge [19-30ans] (1,7822±0,3848) est supérieure à celle de la classe d'âge [31-41 ans] (1,77±0,3513) (Figure 76). La comparaison entre la moyenne de chacune des deux classes d'âge maternel à la moyenne des témoins (1,46±0,00) a montré une différence très hautement significative ($p<0,001$) pour les deux classes (Tableau 16).

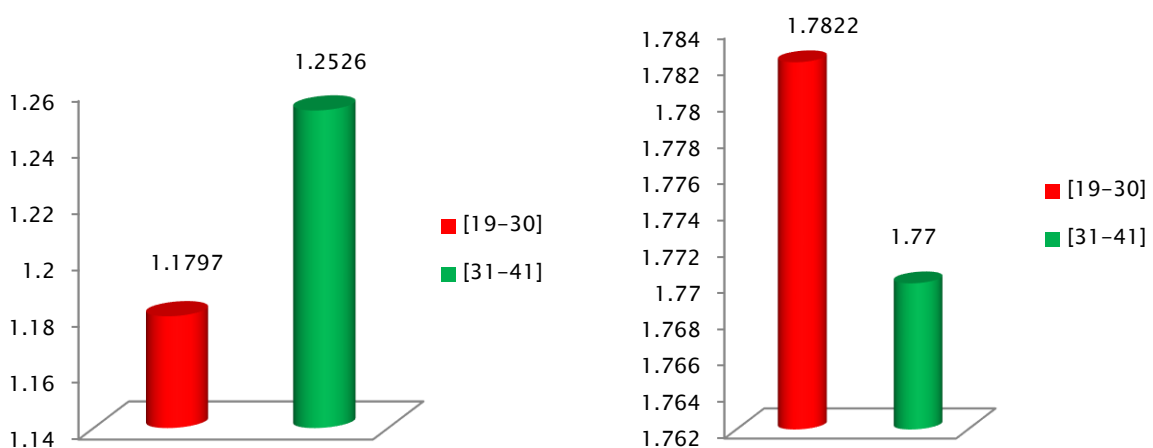


Figure 74: Valeur moyenne de l'IR et âge maternel

Figure 75: Valeur moyenne des ECS et âge maternel

A la lumière de ces résultats, les femmes les plus jeunes [19-30ans] ont présenté plus de dommages chromosomiques par rapport aux femmes plus âgées [31-41ans]. Ainsi, l'âge jeune des femmes ne les met pas à l'abri des lésions génétiques.

Tableau 12: Résultats statistiques des cinq biomarqueurs en fonction de l'âge maternel

		N	Différence moyenne	Moyenne	Erreur std	t	p	Interprétations
IP	[19-30]	12	-0,6676	0,9223	0,0798	-8,366	0,0000	***
	[31-41]	18	-0,5391	1,0508	0,1926	-27,989	0,0000	***
MN	[19-30]	12	-0,0024	0,0057	0,0004	5,710	0,000	***
	[31-41]	18	-0,0010	0,0042	0,0033	0,986	0,341	NS
IS	[19-30]	12	0,1050	0,4651	0,0228	4,599	0,001	**
	[31-41]	18	0,0994	0,4594	0,0223	4,459	0,0000	***
IM	[19-30]	12	-0,0512	0,0288	0,0059	-8,636	0,0000	***
	[31-41]	18	-0,0480	0,0319	0,0076	-6,249	0,0000	***
AC	[19-30]	12	0,0047	0,0080	0,0039	1,183	0,262	NS
	[31-41]	18	0,0011	0,0044	0,0016	0,689	0,500	NS
IR	[19-30]	9	-1,1502	1,1797	0,2253	-5,104	0,001	***
	[31-41]	15	-1,0773	1,2526	0,1383	-7,788	0,000	***
ECS	[19-30]	9	-3,0177	1,7822	0,3848	-7,842	0,000	***
	[31-41]	15	-3,0300	1,7700	0,3513	-8,624	0,000	***

significatif ; * : P<0.05 ; ** : P<0.01 ; *** : P<0.001 et NS : non significatif

4.3 Evolution des indicateurs en fonction de l'âge paternel

Les hommes ont été classés selon leurs âges en trois classes : La première classe est la plus jeune de [23-33ans] ; La deuxième classe est la classe moyenne [34-44ans] et la troisième classe est la plus âgée [45-52ans].

4.3.1 Indice de prolifération

La moyenne de l'indice de prolifération de la troisième classe [45-52ans] ($1,0608 \pm 0,0187$) est la plus supérieure, suivie par celle de la première classe [23-33 ans] ($1,049 \pm 0,0240$) puis celle de la deuxième classe [34-44ans] ($1,039 \pm 0,0045$) (Figure 77). La comparaison de la moyenne de l'indice de prolifération de chacune des trois classes à la moyenne des témoins ($1,59 \pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$) pour les trois classes (Tableau 17).

4.3.2 Fréquence des micronoyaux

La figure 78 montre que la classe d'âge la plus âgée [45-52ans] a la moyenne de micronoyaux la plus basse ($0,0039 \pm 1,6007$) par rapport aux autres classes d'âge, tandis que la classe moyenne [34-44ans] a la moyenne la plus élevée ($0,0053 \pm 0,7851$). La comparaison de la moyenne de la fréquence des micronoyaux de chacune des trois classes d'âge paternel à celle des témoins ($0,0033 \pm 0,000$) a montré une différence très hautement significative pour la deuxième classe ($p < 0,001$) (Tableau 17).

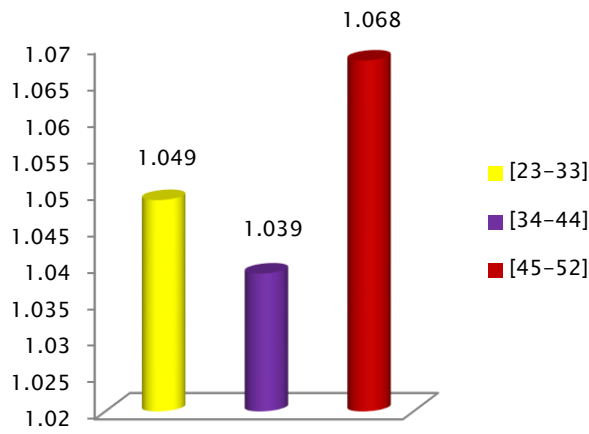


Figure 76: Valeur moyenne de l'IP et âge paternel

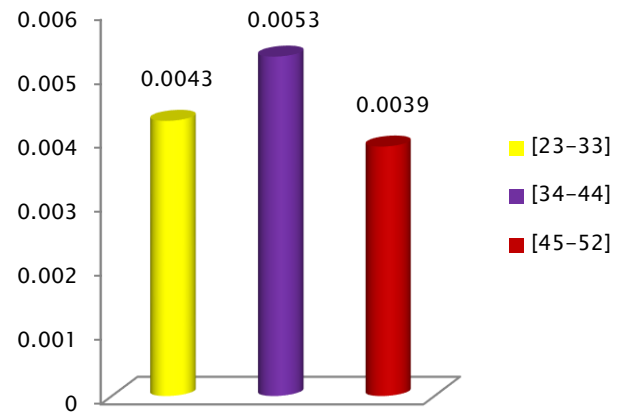


Figure 77: Valeur moyenne des MNX et âge paternel

4.3.3 Indice de Stimulation (IS)

La moyenne de l'indice de stimulation de la classe d'âge paternel la plus jeune [23-33 ans] est la plus basse ($0,4347 \pm 0,032$) par rapport aux deux autres classes d'âge paternel. Tandis que la classe d'âge la plus âgée a la moyenne la plus élevée ($0,4942 \pm 0,0653$) (Figure 79). La comparaison de la moyenne de l'indice de stimulation (IS) de chacune des trois classes d'âge paternel à la moyenne des témoins ($0,36 \pm 0,000$) a montré une différence très significative pour la deuxième classe [34-44 ans] ($p < 0,01$) (Tableau 17).

4.3.4 Indice Mitotique

La moyenne de l'indice mitotique (IM) de la classe d'âge [45-52ans] est la plus élevée ($0,0531 \pm 0,0114$), suivie respectivement par la moyenne de l'IM de la deuxième classe [34-44ans] ($0,038 \pm 0,0114$) et en dernier la moyenne de la classe la plus jeune [23-33 ans] ($0,0376 \pm 0,0112$) (Figure 80). La comparaison entre la moyenne de l'indice mitotique (IM) de chacune des trois classes d'âge paternel à la moyenne des témoins ($0,08 \pm 0,00$) a montré une différence très significative pour la première classe ($p < 0,01$) et significative pour les deux autres classes ($p < 0,05$) (Tableau 17).

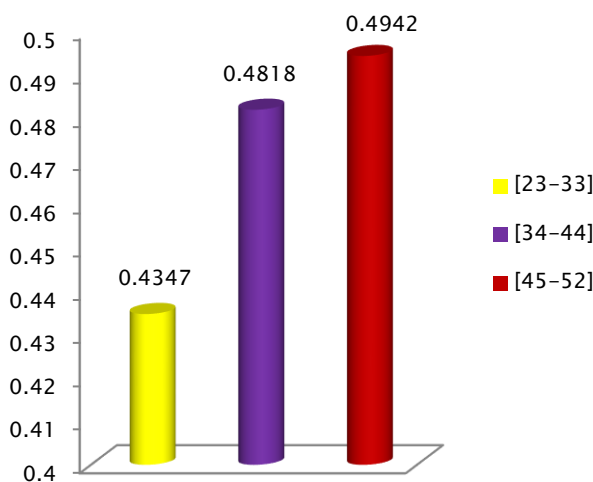


Figure 78: Valeur moyenne de l'IS et âge paternel

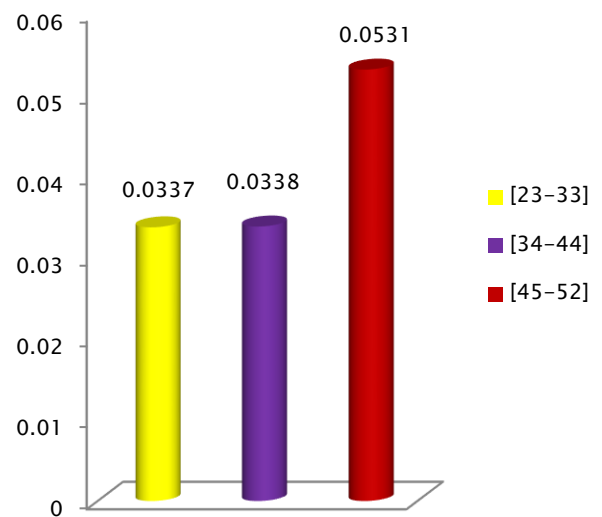


Figure 79: Valeur moyenne de l'IM et âge paternel

4.3.5 Taux des aberrations chromosomiques

La classe d'âge la plus jeune [23-33 ans] a la moyenne du taux des aberrations chromosomiques la plus élevée (0,01±0,0047) suivie par la moyenne de la classe d'âge [34-44 ans] (0,0081±0,0041) (Figure 81). Aucune différence significative n'a été trouvée entre la moyenne du taux des aberrations chromosomiques de chacune des trois classes d'âge paternel en comparant à celle des témoins (0,0033±0,00) ($p>0,05$) comme le montre le tableau 17.

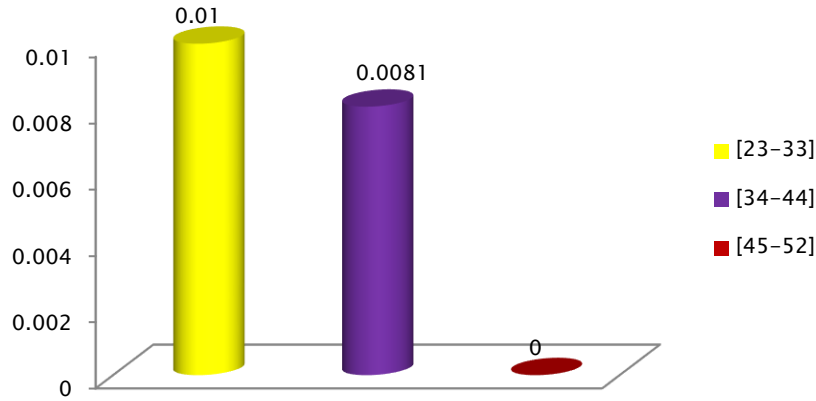


Figure 80: Valeur moyenne du taux des AC et âge paternel

4.3.6 Indice de Réplication

La moyenne de l'indice de réplication de la classe d'âge [45-52ans] est la plus élevée (1,0863±0,1030) suivie par la moyenne de l'IR de la classe moyenne [34-44ans] (1,2487±0,1732) (Figure 82). La comparaison entre la moyenne de l'IR de chacune des trois classes d'âge paternel et la moyenne des témoins (2,33±0,00) a montré une différence très hautement significative pour la deuxième classe d'âge paternel [34-44ans] ($p<0,001$) et une différence très significative pour les deux autres classes (Tableau 17).

4.3.7 Echanges entre les chromatides soeurs

La moyenne du taux des échanges entre les chromatides sœurs de la classes d'âge [34-44ans] est la plus élevée (2,425±0,1095), suivie par celle de la première classe [23-33ans](2,0062 ±0,4403) puis la classe la plus âgée [45-52ans](1,7325±0,3802), comme le montre la figure 83. La comparaison de la moyenne de chacune des trois classes d'âge paternel à la moyenne des témoins (1,46±0,00) a montré une différence très hautement significative pour les trois classes ($p<0,001$) (Tableau 17).

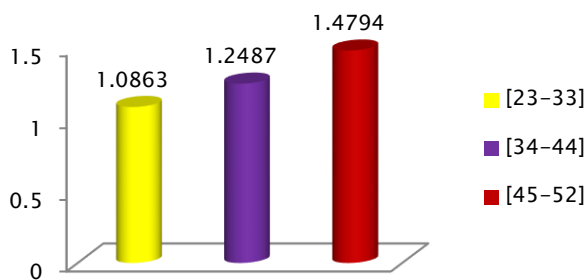


Figure 81: Valeur moyenne de l'IR et âge paternel

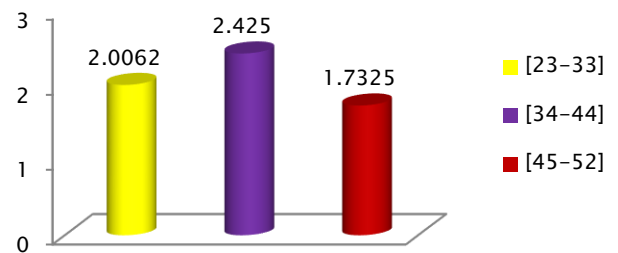


Figure 82: Valeur moyenne des ECS et âge paternel

Les deux classes d'âge paternelles plus jeunes [34-44ans] et [23-33ans] sont les classes qui ont les fréquences les plus élevées de Micronoyaux ($p < 0,001$) et les taux les plus supérieurs des échanges entre les chromatides sœurs ($p < 0,001$) par rapport à la classe la plus âgée [45-52ans] ($p < 0,001$). Ils ont aussi les indices (IP, IM, IS et IR) les plus bas.

Tableau 13: Résultats statistiques des biomarqueurs en fonction de l'âge paternel

		N	Différence moyenne	Moyenne	Erreur std	t	P	Interprétations
IP	[23-33]	10	-0,5409	1,0490	0,0240	-22,481	0,0000	***
	[34-44]	16	-0,5510	1,0390	0,0045	-121,204	0,0000	***
	[45-52]	4	-0,5292	1,0608	0,0187	-28,172	0,0000	***
MN	[23-33]	10	0,0010	0,0043	0,0010	0,985	0,350	NS
	[34-44]	16	0,0020	0,0053	0,0004	4,676	0,000	***
	[45-52]	4	0,0006	0,0039	0,0015	0,413	0,707	NS
IS	[23-33]	10	0,0747	0,4347	0,0332	2,244	0,052	NS
	[34-44]	16	0,1218	0,4818	0,0306	3,976	0,001	**
	[45-52]	4	0,1342	0,4942	0,0653	2,053	0,132	NS
IM	[23-33]	10	-0,0424	0,0376	0,0112	-3,774	0,004	**
	[34-44]	16	-0,0420	0,0380	0,0114	-3,660	0,035	*
	[45-52]	4	-0,0268	0,0531	0,0114	-2,341	0,033	*
AC	[23-33]	10	0,0067	0,0100	0,0047	1,421	0,189	NS
	[34-44]	16	0,0048	0,0081	0,0041	1,175	0,258	NS
	[45-52]	4	NC	NC	NC	NC	NC	-----
IR	[23-33]	8	-1,2437	1,0863	0,2386	-5,211	0,001	**
	[34-44]	12	-1,0813	1,2487	0,1732	-6,242	0,000	***
	[45-52]	4	-0,8505	1,4794	0,1030	-8,251	0,004	**
ECS	[23-33]	8	-2,7937	2,0062	0,4403	-6,344	0,000	***
	[34-44]	12	-2,3750	2,4250	0,1095	-21,673	0,000	***
	[45-52]	4	-3,0675	1,7325	0,3802	-8,068	0,000	***

significatif ; * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$ et NS : non significatif

4.4 Evolution des indicateurs en fonction de la gestité des couples

On a classé les couples en fonction du nombre de grossesses (la gestité) qu'ils ont eu, en deux classes ; la première classe, les couples qui ont deux à trois grossesses [2-3G] et la deuxième classe, les couples qui ont quatre grossesses et plus (≥ 4 gestités).

4.4.1 Indice de Prolifération

La moyenne de l'indice de prolifération de la première classe [2-3G] est la plus élevée ($1,0273 \pm 0,0270$) (Figure 84). La comparaison de la moyenne de l'indice de prolifération de chacune des deux classes de gestité à la moyenne des témoins ($1,59 \pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative pour les deux classes (Tableau 18).

4.4.2 Fréquence des Micronoyaux

La valeur moyenne des micronoyaux de la deuxième classe (≥ 4 gestités) ($0,0051 \pm 0,0003$) est plus élevée par rapport à l'autre classe (Figure 85). La comparaison de la moyenne de la fréquence des micronoyaux de chacune des deux classes de gestité à la moyenne des témoins ($0,0033 \pm 0,000$) a montré une différence très hautement significative pour la deuxième classe ($p < 0,001$), et non significative pour la première classe [2-3 gestités] ($p < 0,05$) (Tableau 18).

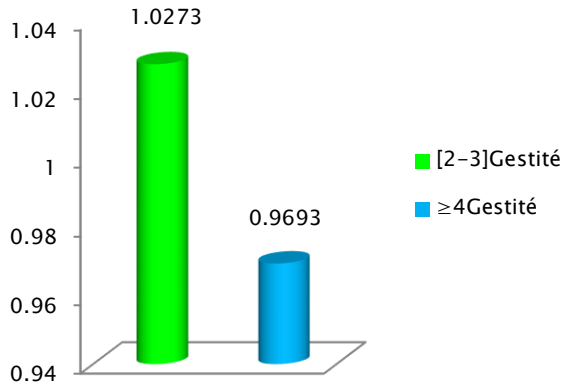


Figure 83: Valeur moyenne de l'IP et gestité

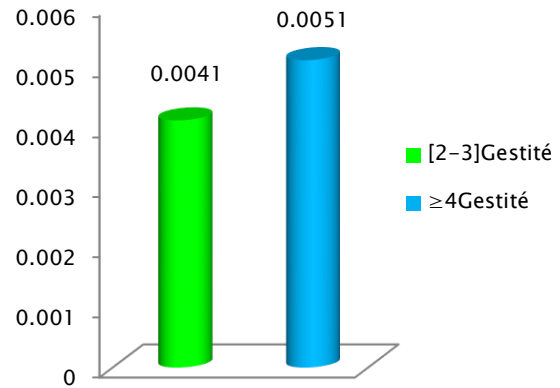


Figure 84: Valeur moyenne de la fréquence des MNX et gestité

4.4.3 Indice de Stimulation

La moyenne de l'indice de stimulation (IS) de la première classe [2-3 gestités] est plus élevée (0,4826±0,0351), par rapport à la deuxième classe (≥4 gestités)(0,4593±0,0176)(Figure 86). La comparaison de la moyenne de l'indice de stimulation (IS) de chacune des deux classes de gestité à la moyenne des témoins (0,36±0,000) a montré une différence très hautement significative pour la deuxième classe ($p < 0,001$) et significative pour la première classe ($p < 0,05$) (Tableau 18).

4.4.4 Indice Mitotique

La moyenne de l'indice mitotique de la première classe de gestité [2-3G] est la plus élevée (0,0415±0,0135) (Figure 87). La comparaison de la moyenne de l'indice mitotique (IM) de chacune des deux classes de gestité à la moyenne des témoins (0,08±0,00) a montré une différence très hautement significative pour la deuxième classe ($p < 0,001$) et très significative pour la première classe ($p < 0,01$) (Tableau 18).

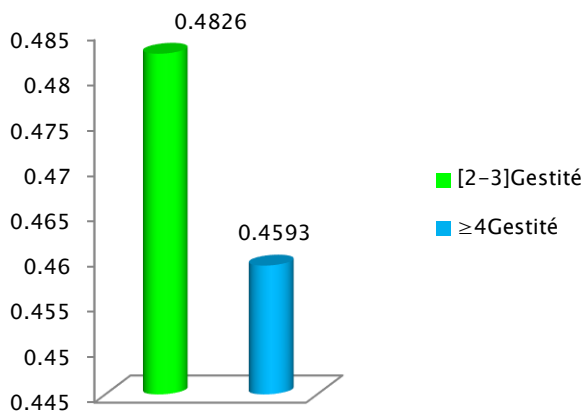


Figure 85: Valeur moyenne de l'IS et gestité

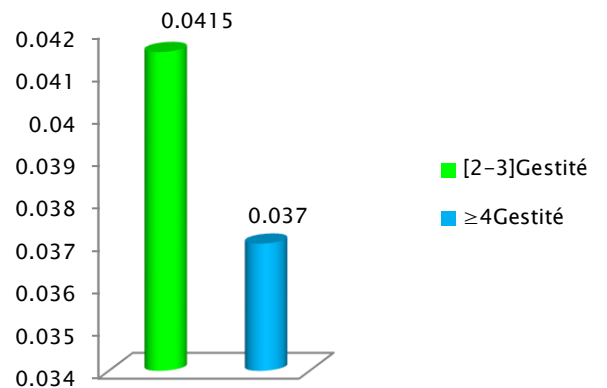


Figure 86: Valeur moyenne de l'IM et gestité

4.4.5 Taux des aberrations chromosomiques

La moyenne des aberrations chromosomiques de la deuxième classe (≥4 gestités) (0,0077±0,0019) est plus supérieure que celle de la première classe [2-3G] (0,0035±0,0014) (Figure 88). La comparaison de la moyenne des aberrations chromosomiques de chacune des deux classes de gestité à celle des témoins

(0,0033±0,00) a montré une différence significative seulement pour la deuxième classe (≥ 4 gestités) ($p < 0,05$) (Tableau 18).

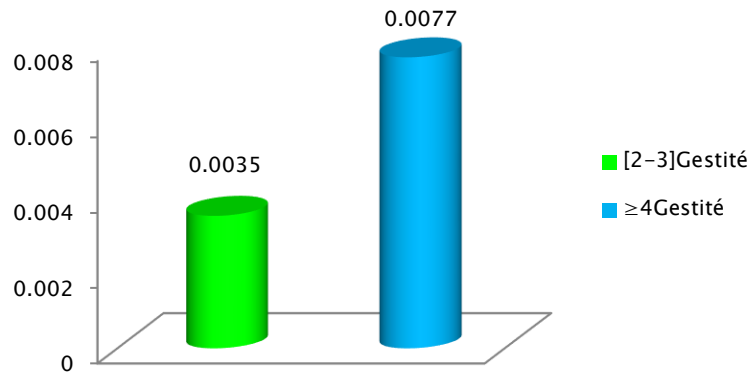


Figure 87: Valeur moyenne du taux des AC et gestité

4.4.6 Indice de Réplication

La moyenne de l'indice de réplication de la première classe [2-3G] de gestité est plus supérieure (1,4680±0,0766) que celle de la deuxième classe (≥ 4 gestités)(1,1663±0,1042) (Figure 89). La comparaison de la moyenne de l'indice de réplication (IR) de chacune des deux classes de gestité à la moyenne des témoins (2,33±0,00) a montré une différence très hautement significative pour les deux classes ($p < 0,001$) (Tableau 18).

4.4.7 Echanges entre les chromatides sœurs

La moyenne des échanges entre les chromatides sœurs de la deuxième classe ≥ 4 gestités est la plus élevée (2,0160±0.5119) (Figure 90). La comparaison de la moyenne des échanges entre les chromatides sœurs de chacune des deux classes de gestité à celle des témoins (1,46±0,00) n'a pas montré de différence significative pour les deux classes ($p > 0,05$) (Tableau 18).

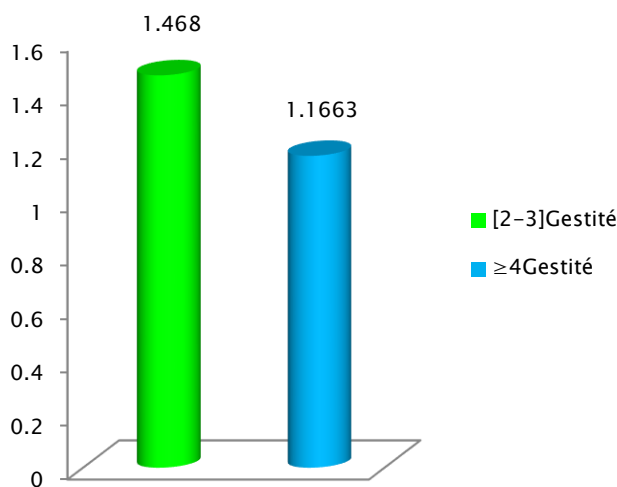


Figure 88: Valeur moyenne de l'IR et gestité

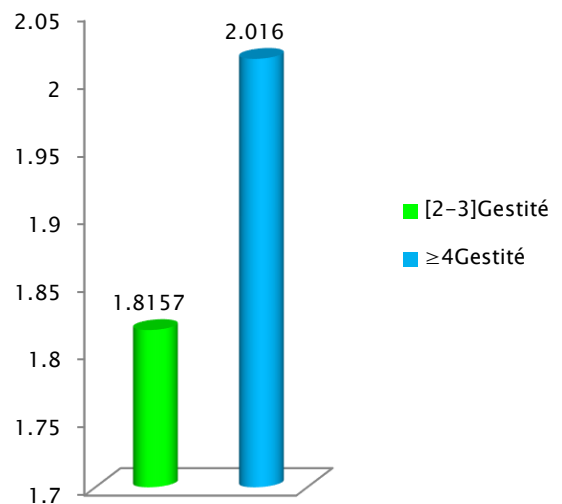


Figure 89: Valeur moyenne du taux des ECS et gestité

Selon ces résultats, les couples multigestes (≥ 4 grossesses) ont la fréquence la plus élevée de Mn ($p < 0,001$) et le taux le plus élevé des aberrations chromosomiques ($p < 0,05$). Ces mêmes couples ont les moyennes les plus basses d'IP, d'IM, d'IS, et d'IR. Les couples multigestes (≥ 4 gestités) ont une génotoxicité plus marquée.

Tableau 18: Résultats statistiques des biomarqueurs en fonction de la gestité

		N	Différence moyenne	Moyenne	Erreur standard	t	P	Interprétations
IP	[2-3G]	7	-0,5626	1,0273	0,0270	-20,813	0,000	***
	$\geq 4G$	23	-0,6206	0,9693	0,0791	-7,842	0,000	***
MN	[2-3G]	7	0,0008	0,0041	0,0010	0,801	0,453	NS
	$\geq 4G$	23	0,0018	0,0051	0,0003	5,191	0,000	***
IS	[2-3G]	7	0,1226	0,4826	0,0351	3,494	0,013	*
	$\geq 4G$	23	0,0993	0,4593	0,0176	5,620	0,000	***
IM	[2-3G]	7	-0,03850	0,0415	0,0088	-4,352	0,005	**
	$\geq 4G$	23	-0,0430	0,0370	0,0054	-7,851	0,000	***
AC	[2-3G]	7	0,0002	0,0035	0,0014	0,190	0,856	NS
	$\geq 4G$	23	0,0044	0,0077	0,0019	2,275	0,033	*
IR	[2-3G]	5	-0,8619	1,4680	0,0766	-11,251	0,000	***
	$\geq 4G$	19	-1,1636	1,1663	0,1042	-11,164	0,000	***
ECS	[2-3G]	5	0,3557	1,8157	0,2188	1,626	0,121	NS
	$\geq 4G$	19	0,5560	2,0160	0,5129	1,084	0,339	NS

significatif ; * : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$ et NS : non significatif

4.5 Etude des différents biomarqueurs en fonction de la parité des couples

Les couples ont été classés en fonction de leur parité en deux classes : les couples qui n'ont aucune parité et ceux qui ont plus qu'une parité (≥ 1).

4.5.1 Indice de Prolifération

Les couples qui ont plus qu'une parité ont la moyenne d'indice de prolifération (IP) la plus supérieure ($1,0407 \pm 0,0122$) (Figure 91). La comparaison de la moyenne de l'IP de chacune des deux classes à la moyenne des témoins ($1,5900 \pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative pour les deux classes ($p < 0,001$) (Tableau 19).

4.5.2 Fréquence des Micronoyaux

La valeur moyenne de la fréquence des micronoyaux de la première classe « aucune parité » est la plus élevée ($0,0063 \pm 0,0003$), suivie par celle de la deuxième classe ($0,0044 \pm 0,0004$) (Figure 92). La comparaison de la moyenne de la fréquence des micronoyaux de chaque classe de parité à la moyenne des témoins ($0,0033 \pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative pour la première classe (aucune parité) ($p < 0,001$), et elle est significative pour la deuxième classe (≥ 1 parité) ($p < 0,01$) ; (Tableau 19).

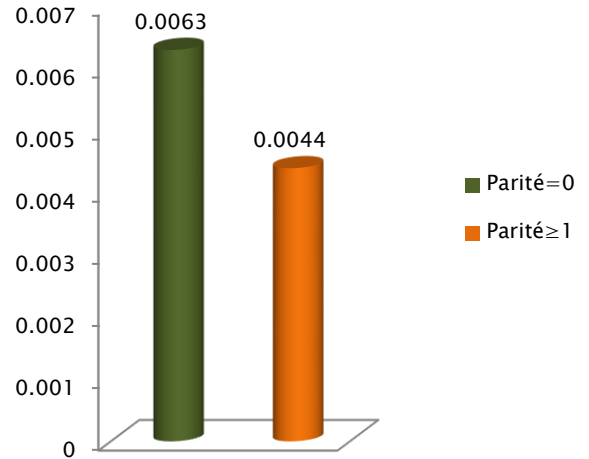
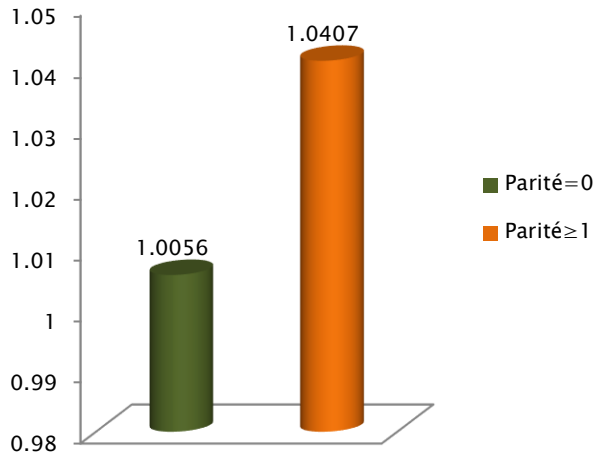


Figure 90: Valeur moyenne de l'IP et parité Figure 91: Valeur moyenne de la fréquence des MNX et parité

4.5.3 Indice de Stimulation

La figure 93 montre que la moyenne de l'indice de stimulation (IS) de la deuxième classe ($P \geq 1$) est plus supérieure ($0,5042 \pm 0,0275$), par rapport à la première classe (0P) ($0,4527 \pm 0,0181$) (Figure 93). La comparaison de la moyenne de l'IS de chacune des deux classes de parité à celle des témoins ($0,3600 \pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative pour la deuxième classe ($p < 0,001$) et très significative pour la première classe ($p < 0,01$) (Tableau 19).

4.5.4 Indice Mitotique

La moyenne de l'indice mitotique de la deuxième classe ($P \geq 1$) est la plus élevée ($0,0444 \pm 0,0088$) (Figure 94). La comparaison de la valeur moyenne de l'indice mitotique de chacune des deux classes de parité à la moyenne des témoins ($0,0800 \pm 0,00$) a montré une différence très significative pour la première classe ($p < 0,01$), et très hautement significative pour la deuxième classe ($p < 0,001$) (Tableau 19).

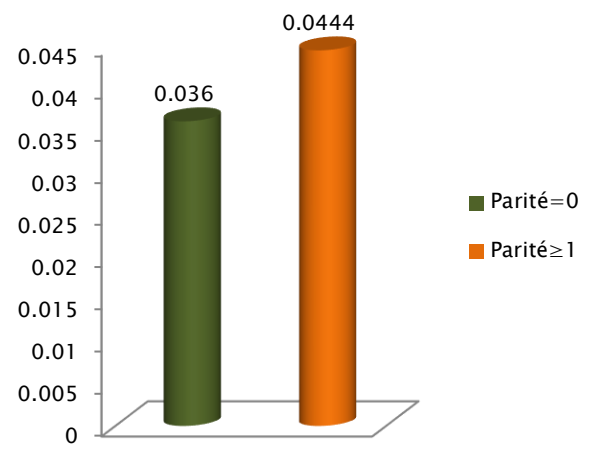
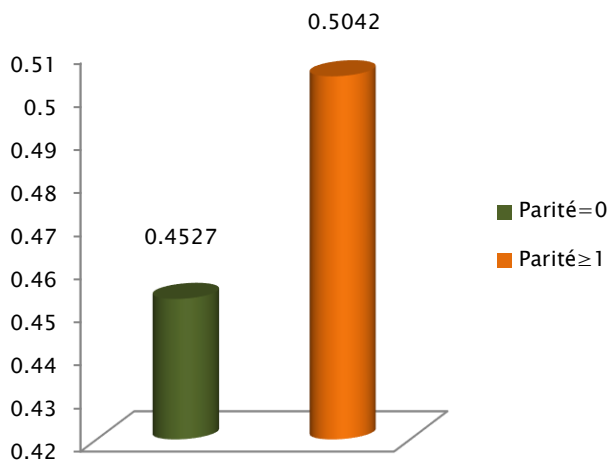


Figure 92: Valeur moyenne de l'IS et parité

Figure 93: Valeur moyenne de l'IM et parité

4.5.5 Taux des aberrations chromosomiques

La moyenne des aberrations chromosomiques de la première classe de parité (P=0) est plus élevée (0,0078±0,0032) par rapport à la deuxième classe (P≥1) (Figure 95). La comparaison de la moyenne du taux des aberrations chromosomiques de chacune des deux classes à la moyenne des témoins (0,0033±0,00) n'a pas montré de différence significative (p>0,05) pour les deux classes (Tableau 19).

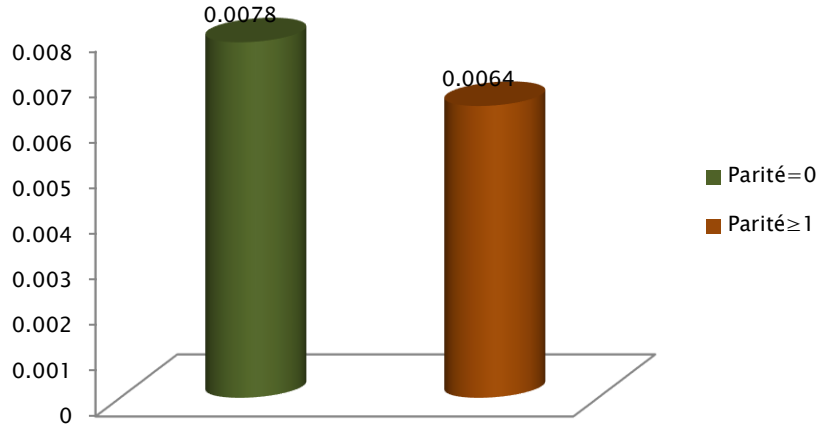


Figure 94: Valeur moyenne du taux des AC et parité

4.5.6 Indice de Réplication

La figure 96 montre que la moyenne de l'indice de réplication de la deuxième classe (P≥1) est la plus supérieure (1,4508±0,1503). La comparaison de la moyenne de l'IR de chacune des deux classes de parité à la moyenne des témoins (2,33±0,00) a montré une différence très hautement significative pour la première classe (P<0,001) et très significative pour la deuxième (p<0,05) (Tableau 19).

4.5.7 Echanges entre les chromatides sœurs

La moyenne des taux des échanges entre les chromatides sœurs de la première classe (P=0) (2,2266±0,3493) est plus élevée par rapport à celle de la deuxième classe (1,7344±0,2360) (Figure 97). La comparaison de la moyenne des échanges entre les chromatides sœurs de chacune des deux classes à celle des témoins (1,46±0,00) n'a pas montré de différence significative (p>0,05) pour les deux classes (tableau 19).

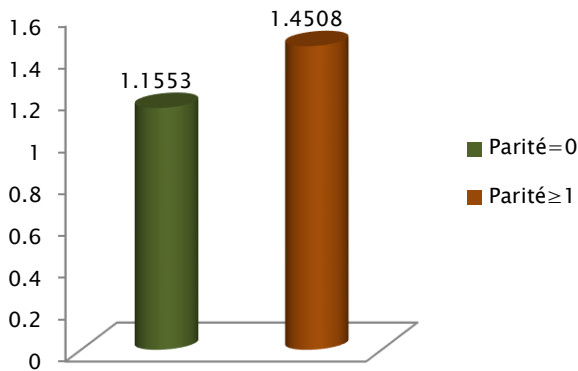


Figure 95: Valeur moyenne de l'IR et parité

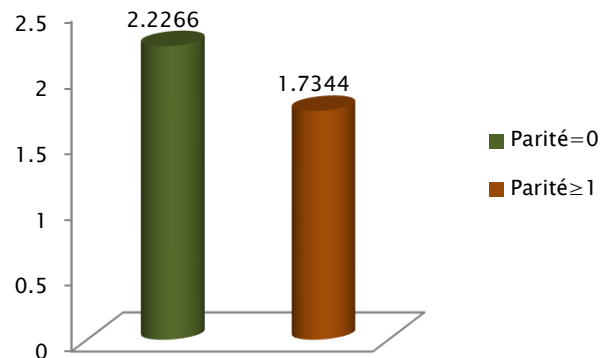


Figure 96: Valeur moyenne du taux des ECS et parité

Ces données confirment que les couples nullipares ont une instabilité chromosomique plus marquée, ils ont la fréquence de micronoyaux ($p < 0,001$) la plus élevée et les indices (IP, IS, IM, IR) les plus bas.

Tableau 14: Résultats statistiques des biomarqueurs en fonction de la parité des couples

		N	Différence moyenne	Moyenne	Erreur std	t	p	Interprétations
IP	P= 0	7	-0,5843	1,0056	0,0355	-16,456	0,000	***
	P \geq 1	23	-0,5493	1,0407	0,0122	-4,775	0,000	***
MN	P= 0	7	0,0030	0,0063	0,0003	7,620	0,000	***
	P \geq 1	23	0,0011	0,0044	0,0004	2,720	0,012	*
IS	P= 0	7	0,1147	0,4527	0,0181	5,113	0,007	**
	P \geq 1	23	0,1442	0,5042	0,0275	5,226	0,002	**
IM	P= 0	7	-0,0439	0,0360	0,0054	-8,089	0,000	**
	P \geq 1	23	-0,0355	0,0444	0,0088	-4,009	0,007	**
AC	P= 0	7	0,0045	0,0078	0,0032	1,403	0,210	NS
	P \geq 1	23	0,0031	0,0064	0,0018	1,736	0,097	NS
IR	P= 0	6	-1,1746	1,1553	0,1010	-11,630	0,000	***
	P \geq 1	18	-0,8791	1,4508	0,1503	-5,846	0,002	**
ECS	P= 0	6	0,7666	2,2266	0,3493	2,195	0,080	NS
	P \geq 1	18	0,2744	1,7344	0,2360	1,163	0,261	NS

significatif ; * : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$ et NS : non significatif

4.6 Evolution des biomarqueurs en fonction du nombre de fausses couches

Les couples ont été classés en fonction du nombre de fausses couches en trois classes; la première classe : les couples qui ont eu deux FCS ; la deuxième classe, sont les couples qui ont eu trois FCS, la troisième classe, sont ceux qui ont eu quatre FCS et plus.

4.6.1 Indice de Prolifération

Les couples de la première classe (2FCS) ont la moyenne la plus supérieure ($1,047 \pm 0,0189$), suivie par la deuxième classe (3FCS) ($1,0016 \pm 0,0398$), puis en dernier la troisième classe (≥ 4 FCS) ($0,9955 \pm 0,0874$) (Figure 98). La comparaison de la moyenne de l'indice de prolifération des trois classes de FCS à celle des témoins ($1,5900 \pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$) pour les trois classes (Tableau 20).

4.6.2 Fréquence des Micronoyaux

La figure 99 montre que la moyenne de micronoyaux augmentent avec le nombre d'accidents abortifs. Ainsi, la moyenne des micronoyaux de la troisième classe (≥ 4 fausses couches et plus) est la plus élevée ($0,0060 \pm 0,0009$), suivie par celle de la deuxième classe ($0,005 \pm 0,0007$) et la moyenne de la première classe est la plus basse ($0,0041 \pm 0,0005$). La comparaison de la moyenne des micronoyaux des trois classes de FC à

la moyenne des témoins ($0,0033\pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$) pour la troisième classe (≥ 4 FC) (Tableau 20).

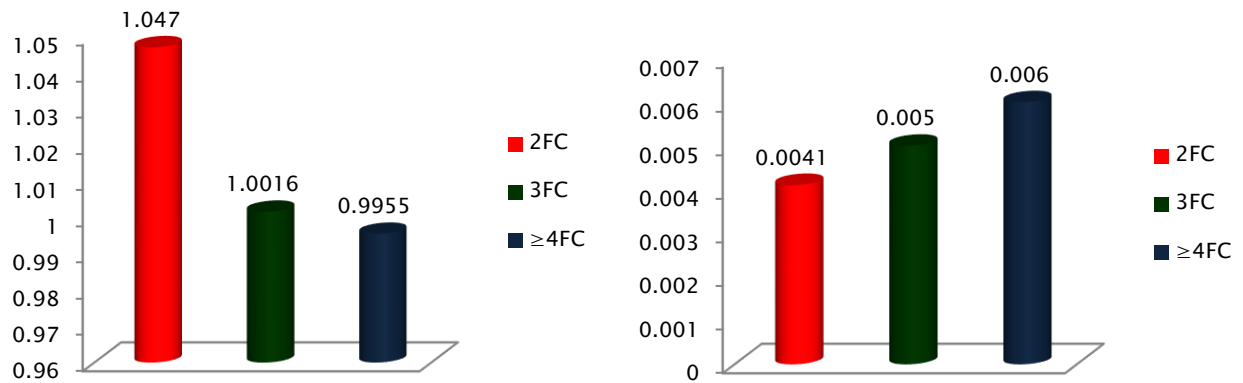


Figure 97: Valeur moyenne de l'IP et nombre de FC Figure 98: Valeur moyenne de la fréquence des MNX et nombre de FC

4.6.3 Indice de Stimulation

La moyenne de l'indice de stimulation de la troisième classe (≥ 4 FC) est plus élevée par rapport aux deux autres classes ($0,4992\pm 0,0264$) (Figure 100). La comparaison de la moyenne de l'IS des trois classes à la moyenne des témoins ($0,3600\pm 0,00$) a montré une différence significative pour la première classe ($p < 0,05$) et très significative pour la deuxième classe ($p < 0,01$) et la troisième classe ($p < 0,01$) (Tableau 20).

4.6.4 Indice Mitotique

La moyenne de l'indice mitotique de la première classe (2FC) est plus supérieure ($0,0398\pm 0,0091$) par rapport aux deux autres classes. Tandis que celle de la troisième classe (3FC) est la plus inférieure ($0,0337\pm 0,0085$) (Figure 101). La comparaison de la moyenne de l'IM de chacune des trois classes à celle des témoins ($0,0800\pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$) pour la deuxième classe (3FC), et elle est très significative ($P < 0,01$) pour la première (2FC) et la troisième classe (≥ 4 FC) (Tableau 20).

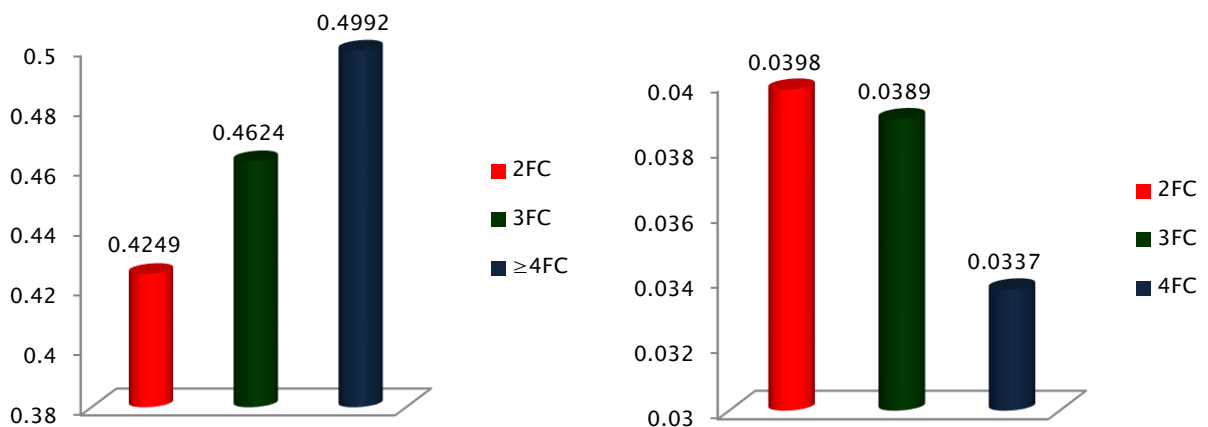


Figure 99: Valeur moyenne de l'IS et nombre de FC

Figure 100: Valeur moyenne de l'IM et nombre de FC

4.6.5 Taux des aberrations chromosomiques

La figure 102 montre que la moyenne du taux des aberrations chromosomiques ($0,0052\pm 0,0019$) est plus basse chez les couples ayant eu deux FCS, tandis que cette moyenne est plus élevée ($0,0083\pm 0,0034$) chez

les couples ayant eu quatre FCS et plus. La comparaison de notre échantillon à la moyenne des témoins (0,0033±0,00) a montré une différence significative ($p < 0,05$) pour la troisième classe ($\geq 4FC$) (Tableau 20).

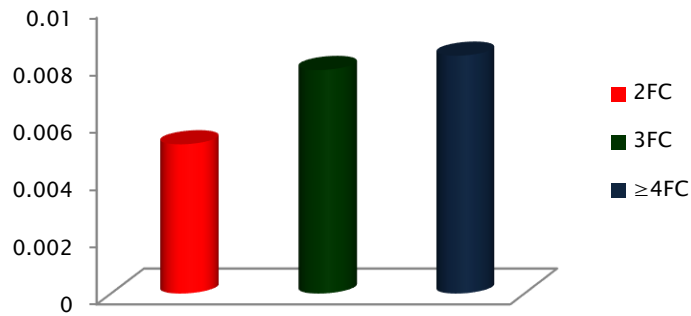


Figure 101: Valeur moyenne du taux des AC et nombre de FC

4.6.6 Indice de Réplication

La moyenne de l'indice de réplication de la première classe (2FC) est plus élevée (1,2627±0,1413) par rapport aux deux autres classes (Figure 103). La comparaison de la moyenne de l'indice de réplication des trois classes de FCS à la moyenne des témoins (2,33±0,00) a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$) pour la première (2FC) et la troisième classe ($\geq 4FC$). Cette différence est très significative pour la deuxième classe ($p < 0,01$) (Tableau 20).

4.6.7 Echanges entre les chromatides soeurs

La moyenne des taux des échanges entre les chromatides sœurs des couples ayant eu quatre FCS et plus dans leurs ATCDS (2,112±0,3910) est la plus supérieure, suivie par celle de la deuxième classe (3FC) (1,824±0,3814), tandis que celle de la première classe (2FC) (1,6554±0,3577) est la plus basse (Figure 103). La comparaison de la moyenne des taux des ECS de chacune des trois classes de FCS à la moyenne des témoins (1,46±0,00) a montré une différence significative ($p < 0,05$) pour la troisième classe ($\geq 4FC$) (Tableau 20).

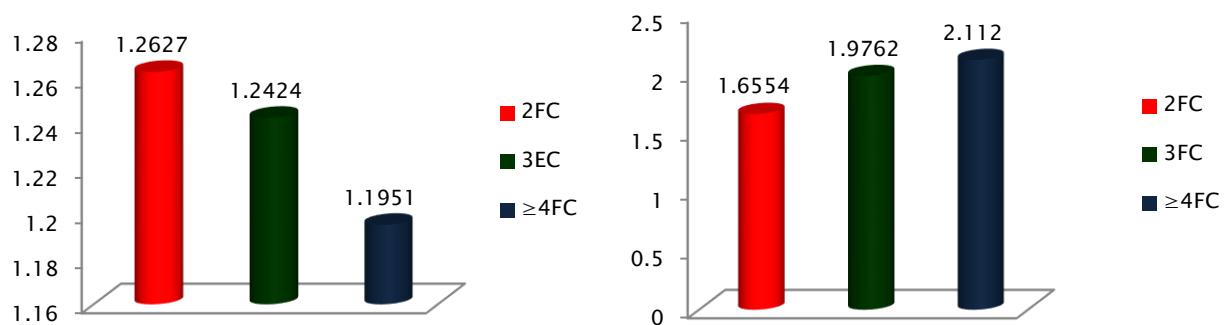


Figure 102: Valeur moyenne de l'IR et nombre de FC Figure 103: Valeur moyenne du taux des ECS et nombre de FC

En résumé, les couples qui ont fait plus d'accidents abortifs ($\geq 4FCS$) ont affiché la fréquence la plus élevée de Mn ($p < 0,001$), le taux le plus élevé des AC ($p < 0,05$), des ECS ($P < 0,05$) et de l'indice de stimulation. Ils ont aussi les indices (IP, IM, IR) les plus bas, témoignant de la perturbation du cycle cellulaire. Ces résultats

reflètent que les couples qui ont vécu l'histoire de plusieurs fausses couches dans leur antécédents ont plus de dommages chromosomiques dans leur lymphocytes circulants.

Tableau 150: Résultats statistiques des biomarqueurs en fonction du nombre de fausses couches

		N	Différence moyenne	Moyenne	Erreur std	t	p	Interprétations
Moyenne d'IP	2 FC	14	-0,5429	1,0470	0,0189	-28,662	0,000	***
	3 FC	7	-0,5883	1,0016	0,0398	-14,753	0,000	***
	≥4 FC	9	-0,5944	0,9955	0,0874	-6,798	0,000	***
Moyenne de MN	2 FC	14	0,0008	0,0041	0,0005	1,468	0,166	NS
	3 FC	7	0,0017	0,0050	0,0007	2,172	0,073	NS
	≥4 FC	9	0,0027	0,0060	0,0004	6,025	0,000	***
Moyenne d'IS	2 FC	14	0,0649	0,4249	0,0226	2,867	0,029	*
	3 FC	7	0,1024	0,4624	0,0255	4,007	0,001	**
	≥4 FC	9	0,1392	0,4992	0,0264	5,273	0,001	**
Moyenne d'IM	2 FC	14	-0,0401	0,0398	0,0091	-4,402	0,002	**
	3 FC	7	-0,0410	0,0389	0,0071	-5,707	0,000	***
	≥4 FC	9	-0,0462	0,0337	0,0085	-5,431	0,002	**
Moyenne d'AC	2 FC	14	0,0019	0,0052	0,0019	1,015	0,329	NS
	3 FC	7	0,0045	0,0078	0,0035	1,268	0,252	NS
	≥4 FC	9	0,0050	0,0083	0,0034	1,465	0,047	*
Moyenne IR	2 FC	11	-1,0622	1,2627	0,1413	-7,513	0,000	***
	3 FC	5	-1,0875	1,2424	0,1846	-5,889	0,004	**
	≥4 FC	8	-1,1348	1,1951	0,1466	-7,738	0,000	***
Moyenne ECS	2 FC	11	-3,1445	1,6554	0,3577	0,546	0,597	NS
	3 FC	5	-2,9760	1,9762	0,2596	1,988	0,087	NS
	≥4 FC	8	-2,6880	2,1120	0,3910	1,667	0,029	*

Significatif ; * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$ et NS : non significatif

4.7 Evolution des biomarqueurs en fonction du nombre d'enfants vivants

Les couples ont été classés en deux classes en fonction du nombre d'enfants vivants (EV) ; la première classe regroupe les couples qui n'ont aucun enfant vivant (0EV); la deuxième classe regroupe ceux qui ont eu au moins un enfant vivant (01EV).

4.7.1 Indice de Prolifération

La moyenne de l'indice de prolifération (IP) de la classe des couples qui ont eu au moins un enfant vivant est la plus supérieure ($1,0270 \pm 0,0367$) (Figure 105). La comparaison de la moyenne de l'indice de prolifération de chacune des deux classes des couples classés selon le nombre d'enfants vivants à la moyenne des témoins ($1,5900 \pm 0,00$), a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$) pour les deux classes (Tableau 21).

4.7.2 Fréquence des Micronoyaux

La moyenne de la fréquence de Micronoyaux ($0,0051 \pm 0,0005$) de la première classe (0EV) est la plus élevée (Figure 106). La comparaison de la moyenne des Micronoyaux de chacune des deux classes à la moyenne des témoins ($0,0033 \pm 0,00$) a montré une différence très significative pour la première classe ($p < 0,01$) et significative pour la deuxième classe ($p < 0,05$) (Tableau 21).

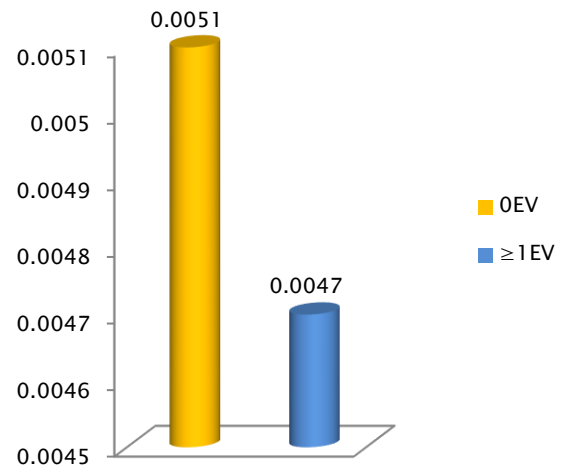
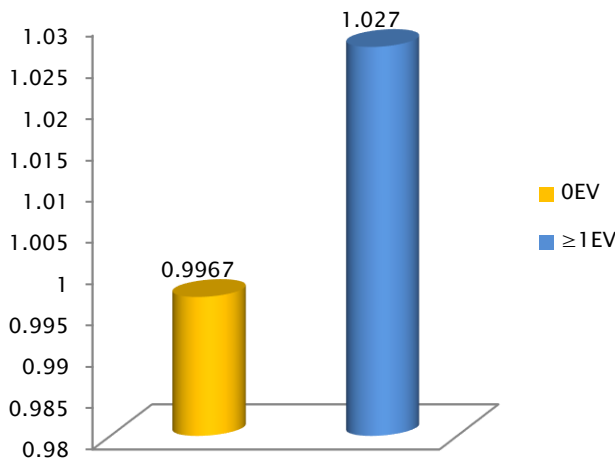


Figure 104: Valeur moyenne de l'IP et nombre d'EV

Figure 105: Valeur moyenne de la fréquence des MN et nombre d'EV

4.7.3 Indice de Stimulation

La moyenne de l'indice de stimulation (IS) de la classe des couples qui n'ont aucun enfant vivant est la plus supérieure ($0,4998 \pm 0,0253$) (Figure 107). La comparaison de la moyenne de l'indice de stimulation de chacune des deux classes de couple classés selon le nombre d'enfants vivants à la moyenne des témoins ($0,3600 \pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$) pour les deux classes (Tableau 21).

4.7.4 Indice Mitotique

La figure 108 montre que la moyenne de l'indice mitotique de la deuxième classe ($\geq 1EV$) est la plus élevée ($0,0399 \pm 0,0068$). La comparaison de la moyenne de notre échantillon à la moyenne des témoins ($0,0800 \pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative pour les deux classes ($p < 0,001$) (Tableau 21).

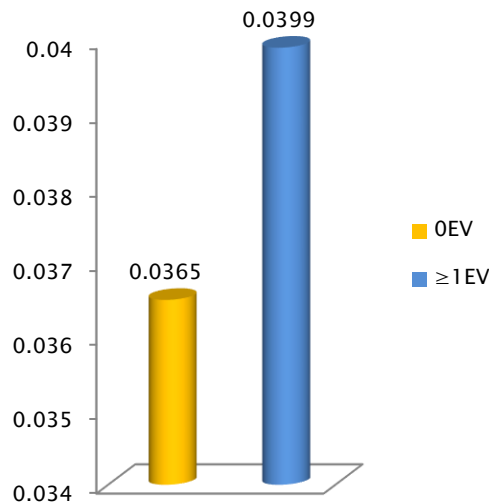
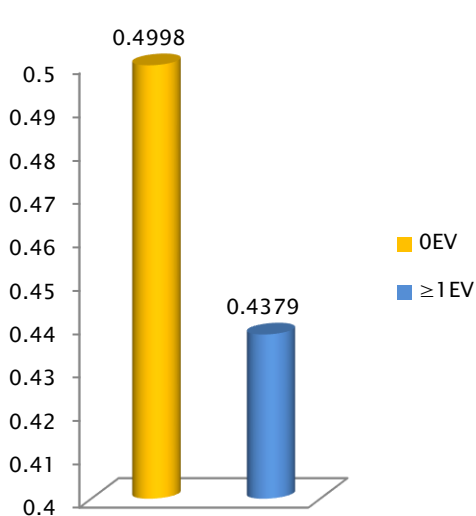


Figure 106: Valeur moyenne de l'IS et nombre d'EV

Figure 107: Valeur moyenne de l'IM et nombre d'EV

4.7.5 Taux des aberrations chromosomiques

La moyenne des aberrations chromosomiques de la première classe (0EV) est la plus élevée (0,0070±0,0019) (Figure 109). La comparaison de la moyenne des aberrations chromosomiques de notre échantillon à la moyenne des témoins (0,0033±0,00) a montré une différence significative ($p < 0,05$) pour la première classe (0EV) (Tableau 21).

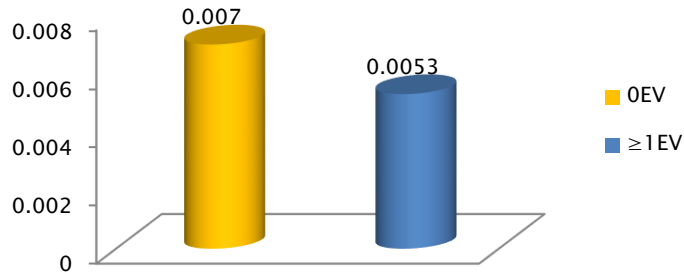


Figure 108: Valeur moyenne du taux des AC et nombre d'EV

4.7.6 Indice de Réplication

La moyenne de l'indice de réplication de la deuxième classe ($\geq 1EV$) est la plus élevée (1,2659±0,1321) (Figure 110). La comparaison de la moyenne de l'indice de réplication des deux classes à celle des témoins (2,33±0,00) a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$) pour les deux classes (tableau 21).

4.7.7 Echanges entre les chromatides sœurs

La moyenne des échanges entre les chromatides sœurs de la deuxième classe ($\geq 1EV$) est la plus élevée (1,9015±0,2840) (Figure 111). La comparaison de la moyenne des échanges entre les chromatides sœurs de chacune des deux classes de couples à la moyenne des témoins (1,46±0,00) n'a pas montré de différence significative ($p > 0,05$) pour les deux classes (Tableau 21).

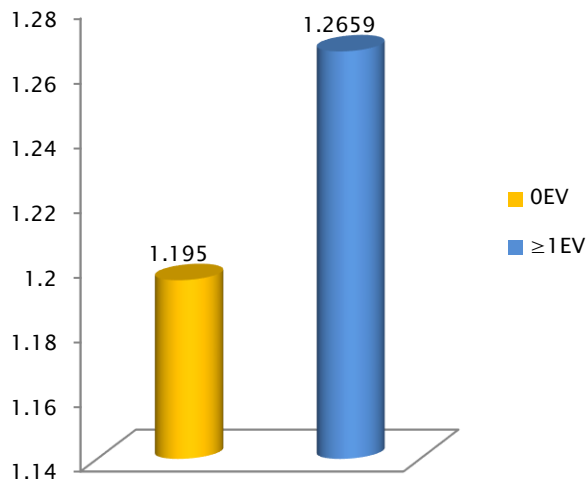


Figure 109: Valeur moyenne de l'IR et nombre d'EV

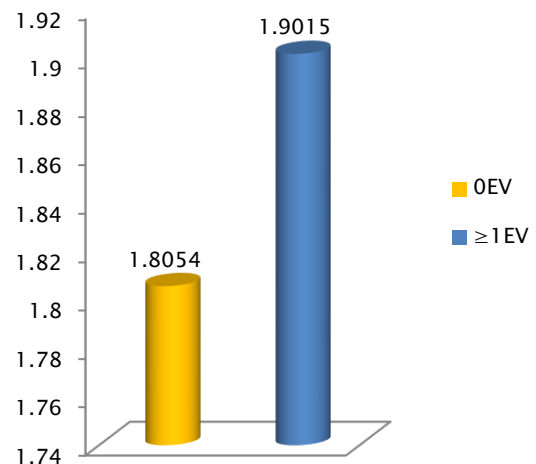


Figure 110: Valeur moyenne du taux des ECS et nombre d'EV

Les couples qui n'ont aucun enfant vivant affichent :

- La fréquence de Micronoyaux la plus supérieure ($p < 0,05$), et la moyenne d'IP, d'IM et d'IR les plus basses par rapport aux couples qui ont au moins un enfant vivant ;
- Le taux des aberrations chromosomiques ($p < 0,05$) et l'indice de stimulation ($p < 0,001$), les plus supérieures ($p < 0,001$) par rapport aux couples qui ont au moins un enfant vivant;

Les couples qui ont le plus de dommages chromosomiques réussissent moins à avoir des enfants vivants.

Tableau 16: Résultats statistiques des biomarqueurs en fonction du nombre des enfants vivants

		N	Différence moyenne	Moyenne	Erreur std	t	p	Interprétations
IP	EV= 0	13	-0,5932	0,9967	0,0422	-14,042	0,000	***
	EV \geq 1	17	-0,5630	1,0270	0,0367	-15,357	0,000	***
MN	EV= 0	13	0,0018	0,0051	0,0005	3,279	0,007	**
	EV \geq 1	17	0,0014	0,0047	0,00049	2,857	0,011	*
IS	EV= 0	13	0,1398	0,4998	0,0253	5,521	0,000	***
	EV \geq 1	17	0,0780	0,4379	0,01776	4,424	0,000	***
IM	EV= 0	13	-0,0423	0,0365	0,0064	-6,761	0,000	***
	EV \geq 1	17	-0,0415	0,0399	0,0068	-5,860	0,000	***
AC	EV= 0	13	0,0045	0,0070	0,0019	0,957	0,048	*
	EV \geq 1	17	0,0020	0,0053	0,0020	1,043	0,317	NS
IR	EV=0	11	-1,1349	1,1950	0,1198	-9,472	0,000	***
	EV \geq 1	13	-1,0604	1,2659	0,1321	-8,025	0,000	***
ECS	EV= 0	11	0,3454	1,8054	0,2884	1,198	0,259	NS
	EV \geq 1	13	0,4415	1,9015	0,2840	1,554	0,146	NS

4.8 EVOLUTION DES BIOMARQUEURS DE GENOTOXICITE EN FONCTION DU NOMBRE DES GROSSESSES PERDUES EN PERIODE PERINATALE

Les couples ont été classés en deux classes en fonction du nombre des grossesses perdues (GP) pendant la période périnatale. La première classe constituée des couples qui n'ont perdu aucune grossesse pendant cette période, et la deuxième classe constituée de ceux qui ont perdu au moins une grossesse.

4.8.1 Indice de Prolifération

La moyenne de l'indice de prolifération de la première classe (0GP) est la plus élevée ($1,051 \pm 0,0129$) (Figure 112). La comparaison de la moyenne de l'indice de prolifération de chacune des deux classes à la moyenne des témoins ($1,5900 \pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$) pour les deux classes (Tableau 22).

4.8.2 Fréquence des Micronoyaux

La moyenne de fréquence des Micronoyaux de la deuxième classe (≥ 1 GP) est la plus supérieure ($0,0053 \pm 0,0005$) (Figure 113). La comparaison de la moyenne des micronoyaux de chacune des deux classes de couples classés en fonction du nombre de grossesses perdues en périnatale à la moyenne des témoins ($0,0033 \pm 0,00$) a montré une différence très significative ($p < 0,01$) pour la deuxième classe (≥ 1 GP) et significative ($p < 0,05$) pour la première classe (0GP) (Tableau 22).

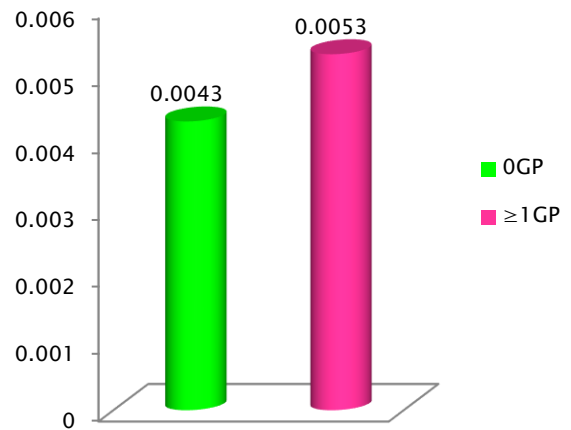
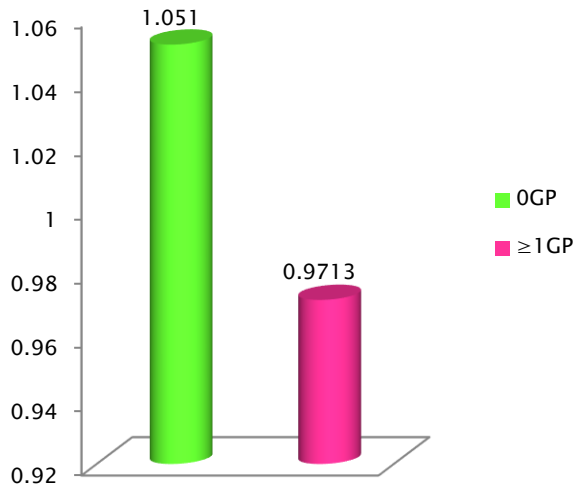


Figure 111: Valeur moyenne de l'IP et GP en périnatale Figure 112: Valeur moyenne de MN et Nbre GP en périnatale

4.8.3 Indice de Stimulation

La moyenne de l'indice de stimulation de la première classe (0GP) est la plus élevée ($0,4742 \pm 0,0185$) (Figure 114). La comparaison de la moyenne de l'indice de stimulation de chacune des deux classes à celle des témoins ($0,3600 \pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$) pour la première classe (0GP), et elle est très significative ($p < 0,01$) pour la deuxième classe ($\geq 1GP$) (Tableau 22).

4.8.4 Indice Mitotique

La moyenne de l'indice mitotique (IM) des couples qui n'ont perdu aucune grossesse est la plus élevée ($0,0406 \pm 0,0060$) par rapport à l'autre classe ($\geq 1GP$) (Figure 115). La comparaison de la moyenne de l'IM de chacune des deux classes à la moyenne des témoins ($0,0800 \pm 0,00$) a montré une différence très hautement significative ($p < 0,001$) pour les deux classes (Tableau 22).

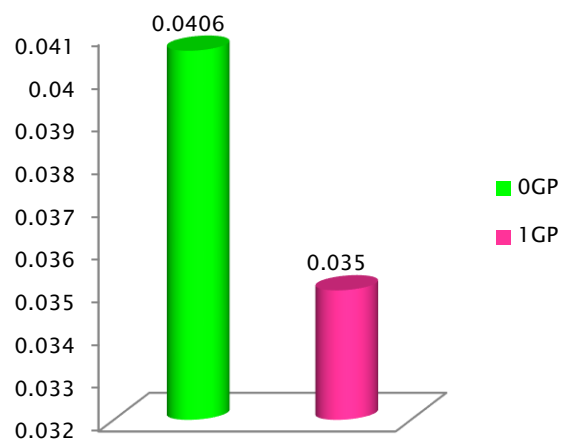
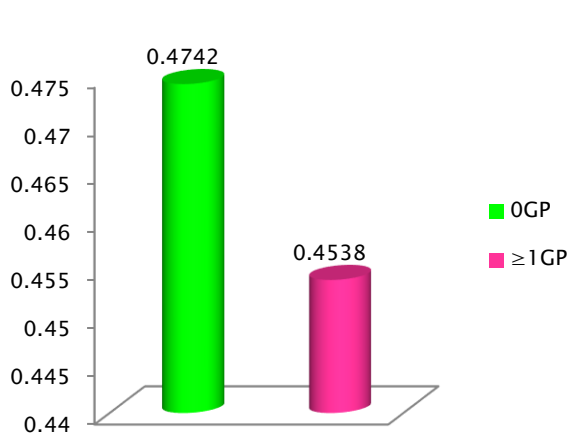


Figure 113: Valeur moyenne de l'IS et Nbre de GP en périnatale

Figure 114: Valeur moyenne de l'IM et Nbre de GP en périnatale

4.8.5 Taux des aberrations chromosomiques

La moyenne des taux des aberrations chromosomiques de la deuxième classe ($\geq 1GP$) est la plus supérieure ($0,0095 \pm 0,0024$) (Figure 116). La comparaison de la moyenne des taux des AC des couples classés en

fonction du nombre des GP en périnatale à la moyenne des témoins (0,0033±0,00) a montré une différence significative pour la deuxième classe ($p<0,05$) (Tableau 22).

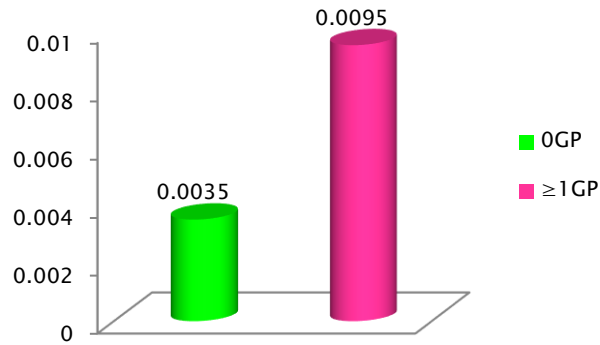


Figure 115: Valeur moyenne du taux des AC et nombre de GP en périnatale

4.8.6 Indice de Réplication

La figure 117 montre que la moyenne de l'indice de réplication de la première classe (0GP) est la plus élevée (1,3142±0,1295). La comparaison de la moyenne de l'indice de réplication (IR) de chacune des deux classes à la moyenne des témoins (2,33±0,00) a montré une différence très hautement significative ($p<0,001$) pour les deux classes (Tableau 22).

4.8.7 Echanges entre les chromatides sœurs

La moyenne des taux des échanges entre les chromatide sœurs des couples qui ont perdu plus d'une grossesse en périnatale est la plus supérieure (2,02±0,2487) (Figure 118). La comparaison de la moyenne des ECS de chacune des deux classes à celle des témoins (1,46±0,00) a montré une différence significative ($p<0,05$) pour la deuxième classe (tableau 22).

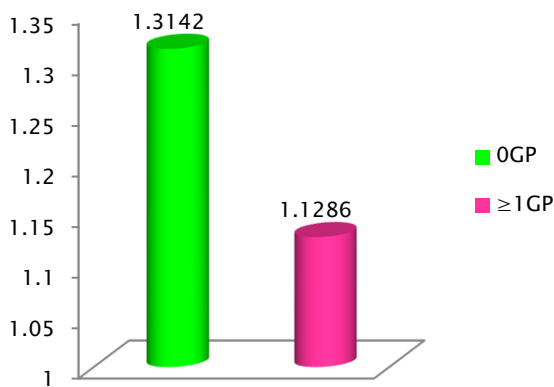


Figure 116: Valeur moyenne de l'IR et nombre de GP périnatale

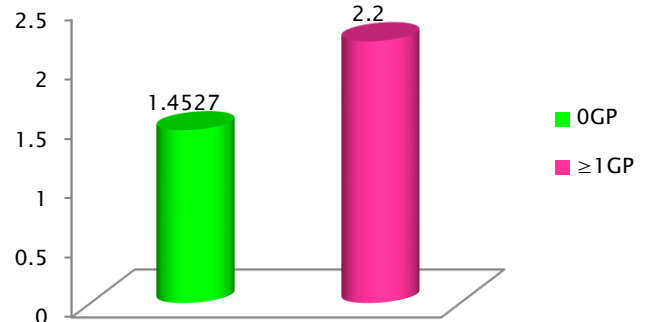


Figure 117: Valeur moyenne des ECS et nombre de GP en périnatale

Les couples qui ont perdu au moins une grossesse en période périnatale ont :

- La fréquence la plus élevée de MN, et les taux les plus élevés des AC, et des ECS ;
- Et les moyennes les plus basses des indices : IP, IS, IM et IR.

A la lumière de ces résultats, il s'avère que les couples qui ont un niveau élevé de génotoxicité ; ont tendance à perdre plus de grossesses en période périnatale (Tableau 22).

Tableau 17: Résultats statistiques des biomarqueurs en fonction des grossesses perdues en périnatale

		N	Différence moyenne	Moyenne	Erreur std	t	p	Interprétations
IP	OGP	16	-0,5389	1,0510	0,0129	-41,715	0,000	***
	≥1GP	14	-0,6186	0,9713	0,0556	-11,119	0,000	***
MN	OGP	16	0,0010	0,0043	0,0004	2,259	0,042	*
	≥1GP	14	0,0020	0,0053	0,0005	3,838	0,002	**
IS	OGP	16	0,1142	0,4742	0,0185	6,149	0,000	***
	≥1GP	14	0,0938	0,4538	0,0263	3,558	0,004	**
IM	OGP	16	-0,0393	0,0406	0,0060	-6,598	0,000	***
	≥1GP	14	-0,0450	0,0350	0,0073	-6,122	0,000	***
AC	OGP	16	0,0002	0,0035	0,0014	0,190	0,852	NS
	≥1GP	14	0,0062	0,0095	0,0024	2,534	0,023	*
IR	OGP	13	-1,0157	1,3142	0,1295	-7,838	0,000	***
	≥1GP	11	-1,2013	1,1286	0,1115	-10,770	0,000	***
ECS	OGP	13	-0,0072	1,4527	0,2831	-0,026	0,980	NS
	≥1GP	11	0,7400	2,2000	0,2487	2,975	0,012	*

Significatif ; * : P<0.05 ; ** : P<0.01 ; *** : P<0.001 et NS : non significatif

5 CORRELATION ENTRE LES DIFFERENTS PARAMETRES ETUDIES

5.1 CORRÉLATION DE RHO SPEARMAN

Pour comprendre les liens existants entre les différents indicateurs testés d'une part et entre ces derniers et certaines variables relatives aux couples d'autre part, nous avons étudié les différentes corrélations possibles. Le tableau 23 résume les principaux résultats obtenus, ainsi on note :

- ❖ Une corrélation positive très significative entre l'IP, l'IM et l'IR ;
- ❖ L'IP est corrélé positivement avec le taux AC et des ECS ;
- ❖ L'IM est corrélé positivement avec l'IS (p<0,01) ;
- ❖ Une corrélation positive entre la fréquence de Mn et le nombre de FC ;
- ❖ L'IM est corrélé positivement et d'une façon très significative à l'IR, les ECS et d'une façon significative aux taux des AC. Il est corrélé négativement à l'âge à la ménarche.
- ❖ Une corrélation entre l'IR et les ECS s'est révélée significativement positive (p<0,05).
- ❖ le nombre de fausses couches (FC), la gestité et le nombre de grossesse perdues en périnatale (GP) sont corrélés d'une façon très significative.
- ❖ Une corrélation positive très significative entre la gestité, la parité et le nombre de grossesses perdues en périnatale.
- ❖ Une corrélation positive très significative entre la parité, le nombre d'enfants vivants et le délai intergénésiq.

Néanmoins, des corrélations importantes quoiqu'elles n'aient pas atteint le seuil de significativité ont été trouvées entre certains paramètres.

Tableau 18: Résultats des corrélations

Corrélation de Rho Spearman														
variable	IP	MN	IS	IM	AC	IR	ECS	FC	Gestité	Parité	EV	GP	Ménarche	DI
IP	1	-0,033	0,339	0,586**	0,435*	0,558*	0,482*	0,159	0,086	-0,056	0,093	0,011	-0,292	0,095
MN		1	0,017	0,061	0,347	0,191	0,161	0,427*	0,178	-0,177	-0,015	0,148	-0,081	-0,072
IS			1	0,742**	0,145	0,343	0,356	0,137	0,023	-0,319	-0,321	0,132	-0,296	-0,118
IM				1	0,432*	0,636*	0,580*	0,055	0,001	-0,152	-0,085	0,013	-0,365*	0,109
AC					1	0,256	0,149	0,179	0,206	-0,024	0,232	-0,020	-0,056	0,172
IR						1	0,471*	0,094	-0,204	-0,399	-0,289	-0,017	-0,371	-0,194
ECS							1	-0,041	-0,070	-0,072	0,066	-0,101	0,087	0,260
FC								1	0,586*	-0,253	-0,142	0,759*	-0,093	-0,015
Gestité									1	0,524*	0,424*	0,800*	0,033	0,355
Parité										1	0,796*	0,115	-0,006	0,597*
EV											1	-0,139	-0,077	0,700*
GP												1	0,068	0,006
Age Ménarche													1	0,095
DI														1

5.2 ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (ACP)

Pour compléter l'étude des résultats nous avons procédé à l'analyse en composante principale dont les paramètres de l'analyse sont les suivants (Tableaux 24, 25) :

Tableau 19: Statistiques descriptives

variables	Moyenne	Déviation standard	N
Nombre de fausses couches (FC)	3,2000	1,9722	30
Gestité	4,6333	2,0083	30
Parité	1,4000	1,1626	30
Enfants vivants (EV)	0,8000	0,8470	30
Grossesses perdues en périnatale (GP)	3,8000	1,9896	30
IP	1,0138	0,1498	30
MN	0,0048	0,0020	30
IS	0,4647	0,0856	30
IM	0,037983	0,0253	30
AC	0,006603	0,0086	30

Tableau20: Vriance totale expliquée

Composantes	Valeurs propres initiales		
	Total	% de la Variance	% Cumulés
1	3,142	31,415	31,415
2	2,360	23,599	55,015
3	1,755	17,552	72,567
4	1,047	10,469	83,036
5	0,717	7,166	90,202
6	0,581	5,808	96,010
7	0,263	2,630	98,640
8	0,132	1,320	99,960
9	0,004	0,040	100,000
10	9,551E-016	9,551E-015	100,000

L'analyse en composante principale (ACP) (Figure 119) a conduit à la construction de la carte qui nous a permis d'interpréter l'homogénéité des paramètres étudiés. Pour ce faire nous avons choisi les composantes 1 et 2 parce qu'ils apportent plus d'informations (55,015%) sur la distribution des paramètres selon les valeurs de : IP, MN, IS, IM, AC, IR, ECS, le nombre de fausses couches (FC), le nombre d'enfants vivants (EV), la gestité, la parité, et le nombre de grossesses perdues en période périnatale (GP).

La figure 119 représente la dispersion des nuages des points qu'est traduit par une structuration claire des paramètres étudiés en trois groupes distincts :

- ✍ Le premier groupe se trouve au quadrant (X+, Y+) renfermant le nombre de fausse couche (FC), le nombre de grossesses perdues en périnatale (GP), la gestité, la valeur du taux des aberrations chromosomiques (AC) et la valeur de la fréquence des micronoyaux (MN), reflétant ainsi leur affinité très importante.
- ✍ Le deuxième groupe se situe également au quadrant (X+, Y+), incluant l'IP, l'IM, l'IS, ce qui est confirme leur lien.

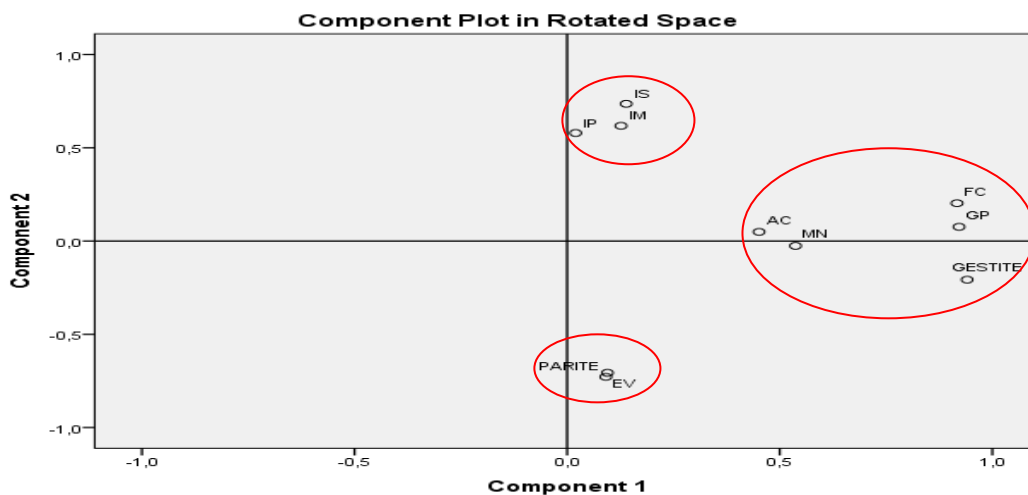


Figure 118: Représentation d'analyse en composante principale

✎ Le troisième groupe se trouve du côté opposé au niveau du quadrant (X+, Y-) reflète une homogénéité entre la parité et le nombre d'enfant vivants (EV).

L'analyse en composante principale, a mis en évidence :

- la relation très étroite entre le degré de dommages chromosomiques, mesurés à l'aide du test des Micronoyaux, et celui des aberrations chromosomiques ; et le nombre de grossesse, la perte de grossesse à la fois précoce (FC) et tardive (période périnatale) ;
- le lien entre la parité et le nombre d'enfants vivants ;
- et l'évolution à la fois du nombre d'enfants vivants et de la parité dans le sens opposé des trois indices « l'IS, l'IM et l'IP ».

ANALYSE ET DISCUSSION DES RESULTATS

PROFIL DES COUPLES SOUFFRANT D'AVORTEMENTS SPONTANES PRECOSES A REPETITION

“ OU SONT PASSEES TOUTES LES CONCEPTIONS ? ”

”WHERE HAVE ALL THE CONCEPTIONS GONE? ”

(C.J.ROBERTS)

L'espèce humaine se caractérise par une importante mortalité prénatale, principalement due aux anomalies de nombres des chromosomes (aneuploïdies). C'est Henri Leridon, épidémiologiste, qui a pour la première fois montré de façon explicite qu'il existait dans notre espèce une forte mortalité prénatale [Leridon, 1977]. Le recensement des grossesses et de leurs issues dans une large cohorte de femmes lui a permis de montrer que moins de 40 % des grossesses arrivaient à terme et que les accidents survenaient très majoritairement durant le premier trimestre de gestation.

Les chances de concevoir un enfant vivant à terme, sans aide médicale, sont estimées entre 21 à 28 % par cycle naturel pour les femmes âgées de 20 à 30 ans [Miller et al., 1980] et la plupart des échecs reproductifs seraient dus à des anomalies chromosomiques des gamètes ou au niveau embryonnaire.

Les changements de style de vie avec la retardation du projet parental ont augmenté l'incidence globale des complications de la grossesse [Dietl, 2005; Iborra et al., 2005]. L'exposition à des facteurs toxiques endogènes et exogènes, produit des dommages de l'ADN, ce qui pourrait affecter plusieurs processus physiologiques associés à la santé de la grossesse. Est-ce depuis les stades précoces tels que la maturation des ovocytes et la qualité du sperme jusqu'aux processus de fin de gestation impliqués dans la placentation et le développement foetal.

C'est dans cette optique que ce travail a tenté d'évaluer le degré de génotoxicité dans les cellules somatiques (lymphocytes) des couples souffrant de FCR. Plusieurs aspects ont été alors cernés ; cette partie de la thèse relate l'analyse et la discussion des différents volets auxquels on est parvenu et qui vont constituer une base pour la formulation de propositions et de recommandations pratiques en vue d'améliorer la prise en charge de ces couples.

On a constaté que les fausses couches à répétition sont l'apanage des couples appartenant à une classe sociale basse ou moyenne. Plus de la moitié des couples est originaire et résidente en milieu rural (56,67%) et 90% d'entre elle ont un bas niveau intellectuel. La moitié des couples est de bas niveau socio-économique, l'autre moitié est de moyen niveau socio-économique et 96,7% ont déclaré ne pas avoir de couverture sanitaire. En effet, l'absence de moyens financiers, et une bonne éducation des couples, pourraient constituer des obstacles à l'accès aux soins et surtout aux soins périnataux. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par d'autres études rapportées dans la littérature [Buss et al., 2006, Maconochie

et al., 2007, Rachootin et al., 1982], d'où l'intérêt d'améliorer à la fois le niveau socioéconomique des couples et l'accès aux soins, pour réduire les complications liées à la grossesse (FCR).

Le mariage consanguin est un problème social majeur dans notre société, en particulier dans les zones rurales et parmi les familles à faible éducation. Il est fréquent dans les populations arabes [Bener et al., 2006, Gazali et al., 2006] mais seules quelques études se sont intéressées à l'association des FCR à la consanguinité [Jaber et al., 2007, Saad et al., 2002]. Bien qu'il existe des informations considérables sur les effets du mariage consanguin sur l'issue de la procréation, il existe un nombre limité des études sur son lien avec la répétition des fausses couches. La notion de consanguinité a concerné 16,7% des couples. Le groupe de couples chez qui, on ne trouve pas de notion de consanguinité, est le groupe qui a fait plus de fausses couches (89,58%) dans ses antécédents. On pense souvent que ces mariages réduisent la fécondité, soit en modifiant la prévalence de la stérilité, ou en augmentant le taux d'avortement. Cependant, plusieurs rapports à travers le monde ont confirmé des niveaux réduits de stérilité et une augmentation du taux de fécondité dans les mariages consanguins. Cela doit être en raison d'une compatibilité immunologique accrue entre la mère et le fœtus [Schull et al., 1970; Rao et Inbaraj, 1977].

L'impact de la consanguinité sur la fertilité humaine et la mortalité périnatale reste controversé. Il y a des études qui ne trouvent pas de différence entre les couples ayant un lien de consanguinité ou non [Abdulrazzaq et al., 1997; al-Abdulkareem et Ballal, 1998; Demirelet al., 1997; Jain et al., 1993; Khlaf, 1988]. D'autres ont établi une relation entre la consanguinité et diverses formes d'infertilité [Zlotogora, 1997] ou des taux élevés d'avortement spontané et de mortinaiissance [Hussain, 1998; Khoury et Massad, 2000; Kulkarni et Kurian, 1990; Stoll et al., 1999; Yassin, 2000]. Il reste à noter qu'il n'y a que quelques données sur l'impact de la consanguinité sur les FCR [Hoet al., 1991].

Il existe une relation significative entre le mode de vie des couples et la perte fœtale. Ainsi, de nombreux facteurs ont été décrits, comme des facteurs de risque de fausses couches spontanées. D'après le présent travail, les hommes fumeurs ont représenté 23,3%, et leurs épouses sont exposées à la fumée du tabac (tabagisme passif). Le tabagisme a un effet néfaste sur le trophoblaste et est associé à un risque accru de fausse couche dose-dépendant. Soares et al (2007) ont trouvé que lors de l'utilisation d'ovocytes de donatrices, les femmes qui fumaient de 0 à 10 cigarettes par jour avaient un taux de grossesse significativement plus élevé (52,2%) que les femmes qui fumaient 10 cigarettes ou plus par jour (34,1%). Ceci suggère qu'un environnement utérin compromis en raison de la fumée de cigarette était responsable d'un taux de grossesse plus faible chez les fumeuses. Les altérations au niveau de l'ovaire, de la trompe et le fonctionnement utérin, ainsi que des perturbations au niveau des hormones contribuent probablement à l'infertilité et aux fausses couches observées chez les femmes fumeuses.

Le tabagisme pourrait avoir un impact sur l'intégrité de l'ADN du sperme, plusieurs études ont noté une augmentation des dommages de l'ADN sous ses effets [Calegero et al., 2009, Vilorio et al., 2007, Kunzle et al., 2003]. Saleh et al (2003) ont attribué l'augmentation des dommages de l'ADN à une augmentation de la quantité des leucocytes séminaux, qui peuvent avoir augmenté la génération des espèces réactives de

l'oxygène [Saleh et al., 2003, Agarwal et al., 2006]. Le mécanisme exact par lequel les leucocytes et les espèces réactives de l'oxygène affectent la fertilité reste non clair, bien qu'il soit supposé être lié à la réponse inflammatoire induite par les métabolites de la fumée de cigarette [Saleh et al., 2003].

La fonction endocrinienne peut également être affectée par le tabagisme, car l'augmentation des taux sériques des deux hormones, « la FSH et la LH » et la diminution de la testostérone ont été rapporté [Terzioglu, 2001]. Une étude prospective auprès de couples mariés depuis peu ; chez qui des dosages biologiques ont été réalisés pour détecter les grossesses précocement ; a rapporté une augmentation du risque de fausse couche en association avec le tabagisme paternel [Venners et al., 2004]. Une autre étude prospective n'a pas mis en évidence une augmentation du risque de fausses couches chez les femmes non fumeuses en association avec l'exposition à la fumée du tabac [Windham et al., 1999].

Personne des couples étudiés ne consomme de l'alcool. Une méta analyse a mis en évidence une augmentation du risque de FC sous l'effet de la consommation féminine d'alcool avec des seuils compris entre 5 et 10 verres d'alcool par semaine [Kumar, 2011].

93,3% des femmes ont déclaré être des consommatrices de thé et 30% d'entre elles sont des consommatrices de café. Tandis que 100% des hommes consomment du thé et 60% consomment du café. La substance chimique de la caféine est la 1,3,7-triméthylxanthine, on la retrouve dans le café, le thé et certains sodas. Elle diminue le flux sanguin placentaire en augmentant le taux des catécholamines circulantes [Kirkinen et al., 1983]. Si elle traverse la barrière placentaire, elle est peu métabolisée chez le fœtus du fait de l'imaturité du système enzymatique [Benammar et al, 2012].

Une consommation de la caféine en périconceptionnelle supérieure à 100 mg/j (plus d'une tasse de café) est associée à une prévalence accrue de FCR. La caféine passe facilement de la mère au fœtus par le placenta. Le fœtus en développement peut avoir des taux sanguins de caféine plus élevés que sa mère en raison d'un métabolisme immature [Klebanoff, et al., 1999]. Certaines études ont montré que les femmes enceintes qui consommaient de grandes quantités de caféine (cinq tasses ou plus de café par jour) étaient deux fois plus susceptibles de faire une fausse couche que celles qui consommaient moins. On pense également qu'un apport élevé en caféine pourrait augmenter le risque de perte fœtale, d'accouchement prématuré et de bébé à faible poids de naissance [Bolumar, et al., 1997; Ford, et al., 1998 et Eskenazi, 1999].

Les couples de l'étude ont déclaré qu'ils consommaient l'eau de robinet dans 53,3% des cas, le reste de consommaient l'eau de puits (36,7%), et l'eau de source (10%). L'étude du nombre de fausses couches en fonction de l'eau consommée a montré une différence significative ($p < 0,05$) pour l'eau de source et proche de la significativité ($p = 0,065$) pour l'eau de puits. D'autres travaux ont rapporté l'existence d'un lien entre la nature de l'eau consommée et la survenue de fausse couche. Une étude faite sur des femmes enceintes a révélé une augmentation significative des avortements spontanés chez celles qui buvaient l'eau du robinet en opposition à celles qui buvaient de l'eau embouteillée. En se basant sur des études comparables, les

buveuses d'eau commercialisée semblaient avoir eu un faible risque, et les buveuses de l'eau souterraine pourraient avoir eu des risques légèrement élevés de FC [Irva et al., 1989].

La majorité des femmes étudiées sont en surpoids (76,67%) et 3,33% sont obèses. La comparaison entre l'issue de la grossesse (accouchement/FC) par rapport à l'IMC a montré une différence significative ($p < 0,05$). Ainsi, l'IMC influence l'évolution de la grossesse, des preuves récentes ont indiqué que les femmes obèses sous traitement contre l'infertilité ont un risque accru de fausse couche spontanée [Hamilton-Fairley et al., 1992; Wang et al., 2000]. Cependant, ce point a été controversé par d'autres études qui n'ont pas trouvé que l'obésité constitue un facteur de risque des FCR [Lashen et al., 1999; Roth et al., 2003; Risch et al., 1990].

Les femmes ayant un antécédent pathologique ont représenté 13,3% des cas. L'étude du nombre de FC en fonction des ATCDs pathologiques des couples a montré une différence proche de la significativité ($p = 0,075$) (tableau 12). En effet une relation significative entre les maladies chroniques et les complications liées à la grossesse, en particulier les pertes fœtales (FC) a été reconnue [Casson et al., 1997; Rosemary et al., 2002, Rochat, et al., 1988]. Une multiplication par quatre du taux d'avortements spontanés a été rapportée, chez les femmes enceintes diabétiques de type I [Casson et al., 1997; Rosemary et al., 2002]. Les études de Rochat et ses collaborateurs ont également montré une perte maternelle et fœtale significative due à une hypertension incontrôlée révélée au cours de la grossesse ou aggravée par la grossesse. Une forte association entre la perte fœtale et les troubles thyroïdiens a été également bien démontrée [Surrey et al., 2002].

Bernhard et ses collaborateurs (2020), ont montré que la perte d'ADN et la stabilité du génome sont associées aux maladies métaboliques. La résistance à l'insuline, le taux élevé de glucose sanguin, et l'augmentation de la graisse corporelle (surpoids) sont liés à un état inflammatoire chronique élevé. Cela amplifie le stress oxydatif, et entraîne des dommages oxydatifs de l'ADN, altérant le processus de prolifération cellulaire et entraînant des mutations. Ces événements augmentent tous la possibilité de développer un dysfonctionnement cellulaire des tissus et des organes. Ces dommages de l'ADN ont été confirmés par une augmentation de la fréquence des micronoyaux selon l'étude [Bernhard et al, 2020].

Depuis les études précédentes sur les maladies chroniques, il existe une forte association entre avoir une maladie chronique et la survenue d'avortement. Il faut s'attendre à ce que les couples qui souffrent de ces maladies, auront un risque élevé de perte fœtale. C'est dire qu'il faut contrôler toute maladie chronique avant de tenter à concevoir.

Un seul des couples étudiés a été traité pour une infection sexuellement transmissible (IST). Une étude multivariée mexicaine a conclu à l'absence d'association significative entre l'infection cervicale à HPV et la survenue d'avortement [Conde-Ferraz et al, 2013]. Concernant les couples souffrant d'ASPR, cette association avec l'infection cervicale à HPV n'est pas non plus retrouvée. Ainsi, une infection cervicale à HPV n'est pas un facteur de risque d'ASPR. Conformément à la littérature, l'analyse de l'association entre

une infection vaginale diagnostiquée sur un prélèvement vaginal chez des femmes enceintes avant 16 SA et la répétition des FCS a montré des résultats discordants [Donders et al., 2000 ; Nigro et al., 2001].

L'âge moyen à la ménarche des femmes était 12,67ans. Les femmes qui ont eu leurs premières règles à un âge entre [12-15ans], ont fait le plus grand nombre de fausses couches (Figure44). Une corrélation négative a été trouvée entre l'âge à la ménarche et l'indice mitotique (IM) (tableau 32). Cependant, on ne trouve pas de différence significative entre les grossesses qui ont évolué vers des FCS et celles qui ont évolué vers un accouchement ($p > 0,05$) par rapport à l'âge à la ménarche (Tableau12).

Le statut hormonal de la femme (hormones sexuelles), pourrait avoir un lien avec les pertes fœtales. Les données d'une enquête norvégienne sur la planification familiale ont été exploitées pour étudier la relation entre l'âge à la ménarche et le taux d'avortement spontané. Ce taux était de 1,5 à 2 fois plus élevés chez les femmes qui ont eu leurs premières règles à 12 ans ou moins que chez celles ayant un âge à la ménarche à 14 ans ou plus [Liestøl, 1980]. La possibilité qu'une différence du taux puisse être attribuée à des facteurs sociaux a été examinée, mais aucune relation significative n'a été trouvée. Le lien entre l'âge à la ménarche et le taux d'avortement spontané peut s'expliquer par la baisse de la fertilité des jeunes mères rapporté par Kiernan (1977).

Aucun travail à nos jours, n'a étudié l'âge à la ménarche et son lien avec la génotoxicité. Seuls, Landi et ses collaborateurs (1999), ont étudié les variations de la fréquence des MNX, des AC, et des ECS durant le cycle menstruel. Ils ont observé des fluctuations significatives de la fréquence des ECS et des AC. Il a été démontré que les ECS ont atteint une valeur maximale en fin de menstruation et une valeur faible au moment de l'ovulation, tandis que les AC ont montré une augmentation continue du début du cycle menstruel jusqu'au moment de l'ovulation et une diminution progressive par la suite. Il n'y avait pas de fluctuation de la fréquence de MN de manière statistiquement significative.

Il a été suggéré que les stéroïdes peuvent induire l'enzyme topoisomérase II, impliquée dans les cassures et le réassemblage de l'ADN double brin [D'Souza et al., 1988]. D'autre part, on sait que les hormones sexuelles peuvent moduler l'activité des cytochromes P450 [Balogh et al., 1990; Henderson et al., 1992], qui sont impliquées dans le métabolisme des mutagènes endogènes et exogènes. Une autre hypothèse concerne la mutagénicité des hormones elles mêmes, mais pour l'instant il n'y a pas de preuves à l'appui [Liehr et al., 1986]. Il apparaît donc difficile de démontrer le rôle direct des hormones dans la mutagénèse.

86,7% des femmes sujettes de notre étude, ont déclaré avoir utilisé une contraception orale (CO) comme méthode contraceptive pour une durée moyenne de 31 mois. Le délai entre l'arrêt de la contraception orale et la grossesse est de 1,96 mois en moyenne. Les résultats ont montré que le délai entre l'arrêt de la CO et le fait de concevoir, semble jouer un rôle dans l'issue de la grossesse (FC/accouchement) ($p < 0,05$) (Tableau 11), de même l'étude du nombre de FC en fonction de la prise de CO avant la survenue de la FC a montré une différence significative ($p < 0,05$) (tableau 12).

Les données de la littérature concernant la consommation des contraceptifs oraux et le risque de fausse-couche sont contradictoires. Enguídanos et ses collaborateurs ont conclu que leur consommation pendant 2 ans et plus avant que la femme tombe enceinte pourrait être associée à un risque de fausse couche [García-Enguídanos et al., 2005]. Tandis que, Ford et ses collaborateurs (1995) ont démontré une diminution très significative du taux de FC chez les femmes âgées de plus de 30 ans et qui ont utilisé la pilule contraceptive pendant 9 ans ou plus. Étant donné que l'aneuploïdie liée à l'âge chez l'Homme survient probablement comme un résultat direct ou indirect de l'épuisement des follicules. Ils ont proposé que l'utilisation à long terme de la pilule contraceptive protège contre l'avortement dû à l'aneuploïdie en préservant le nombre de follicules.

Les données de plusieurs laboratoires suggèrent que les œstrogènes et les progestatifs exogènes peuvent provoquer des aberrations cytogénétiques dans les lymphocytes des femmes prenant des CO. D'autres études n'ont pas démontré d'augmentation de cassures chromosomiques chez les utilisatrices de pilules. En plus des rapports sur les effets néfastes possibles des hormones synthétiques sur les chromosomes lymphocytaires, une évaluation cytogénétique de huit avortements de femmes qui avaient déjà pris des CO, a révélé que six avaient des constitutions chromosomiques aberrantes [Carr, 1967]. Des expériences ultérieures sur des rats [Beaconsfield et Ginsberg, 1968], des chiens [Williams et al., 1971], et sur des hamsters [Williams et al., 1972] indiquent que ces composés peuvent induire des anomalies cytogénétiques des cellules germinales.

Les hormones sexuelles féminines peuvent affecter d'autres processus métaboliques ou biochimiques avec comme résultat une légère augmentation des dommages chromosomiques dans les lymphocytes. Plus de 80 agents physiques, chimiques et biologiques, ont été reconnu comme des provocateurs de cassures chromosomiques dans les cellules des mammifères [Shaw, 1970]. Les hormones synthétiques pourraient améliorer les propriétés de cassure chromosomique de l'un de ces agents ou d'interférer avec les mécanismes de réparation chromosomique.

Elles interviennent dans divers paramètres métaboliques et biochimiques de l'organisme, et il ne semble pas déraisonnable de supposer que l'utilisation de contraceptifs oraux pourrait créer secondairement in vivo une condition qui peut être à l'origine d'une légère augmentation de la fréquence des cassures chromosomiques [Littlefield et al, 1975]. Une enquête plus large et plus approfondie serait nécessaire pour mieux cerner ces constats.

L'âge moyen des femmes est de $30,43 \pm 1,008$ ans et la classe la plus âgée est comprise entre [31-41 ans], représentant 60% des cas. Cette classe d'âge a le taux le plus élevé de FC (68,75%). Ces résultats montrent une augmentation du taux de FC avec l'augmentation de l'âge maternel. L'âge moyen des hommes est de $36,17 \pm 1,414$ ans, la classe d'âge [34-44 ans] représente plus de la moitié (53,34%). Le taux de FC de cette classe d'âge est le plus élevé (48,96%). Ces données corroborent celles rapportées par la littérature, il est bien connu que le risque d'avortement augmente avec l'âge de la mère [Newcomb et al., 1991 ; Anderson, 2000]. Dans une enquête multicentrique menée sur les couples ayant eu des fausses couches, le risque de

FC était plus élevé si la femme est âgée de 35 ans et plus. Cependant l'augmentation du risque était beaucoup plus importante pour les couples composés d'une femme âgée de 35 ans ou plus et d'un homme âgé de 40 ans ou plus [De La Rochebrochard et Thonneau, 2006]. Le résultat de l'enquête montre que le risque d'une issue défavorable de grossesse est plus élevé, si les deux partenaires ont un âge avancé; c'est-à-dire que l'analyse des facteurs de risque de FC doit tenir compte à la fois de l'âge maternel et paternel.

L'augmentation de l'espérance de vie, l'entrée des femmes sur le marché du travail et l'utilisation large de la contraception, ont contribué aux phénomènes sociaux du retard du projet parental et le report de la paternité au milieu ou à la fin de la trentaine. Le développement que connaissent les technologies de la procréation médicale assistée (PMA) ont permis aux couples plus âgés d'espérer concrétiser leurs aspirations à une progéniture saine plus tard dans la vie.

Il est bien établi que l'âge de la femme est le principal facteur limitant la fertilité et les bons résultats reproductifs [Balasch et al., 2010, Tatone et al., 2008]. La tendance à une parentalité plus âgée est également vraie pour les hommes. En Allemagne, l'âge médian des pères mariés est passé de 31,3 ans en 1991 à 33,1 ans en 1999 [Kuhnert et al., 2004]. La même tendance a également été observée dans l'Angleterre, en 1993, les pères âgés de 35 à 54 ans représentaient 25% des naissances. Dix ans plus tard, ce pourcentage est passé à 40% [Bray et al., 2006]. Par conséquent, il convient également de prêter attention à l'influence des âges paternels sur le résultat reproductif. Une étude cas-témoins portant sur 13 865 femmes a révélé qu'une augmentation de l'âge paternel est significativement associée à l'avortement spontané, indépendamment de l'âge maternel et de multiples autres facteurs [Kleinhaus et al., 2006]. Slama et al (2005) ont observé que le risque d'avortement spontané était presque deux fois plus élevé chez les hommes âgés de 45 ans que parmi ceux âgés de 25 ans. L'âge paternel à 40 ans devient un facteur de risque de fausses couches lorsque la femme est âgée de plus de 30 ans.

L'étude de l'histoire obstétricale des couples a mis en évidence son caractère chargé d'accidents obstétricaux. Ainsi, les trente couples étudiés ont eu 139 grossesses durant leur vie reproductive qui a duré en moyenne 5,23 ans. Plus de 93 % des femmes sont multigestes avec une parité moyenne seulement de $1,4 \pm 0,212$. Avoir ou non des enfants vivants et en bonne santé reste le meilleur critère pour juger de la bonne reproductivité des couples. Ainsi, sur les 139 grossesses, 24 grossesses seulement ont pu aboutir à des enfants vivants (EV) soit 17,3% et 115 grossesses ont été perdues (Figure 38). La moyenne d'enfants vivants par couple est de 0,8 EV. Ces résultats témoignent fortement que les couples étudiés ont un mauvais résultat obstétrical. Seulement 24,5% des grossesses ont abouti à des accouchements à terme et quatre couples ont eu des bébés malformés.

Les couples multigestes, nullipares et ceux qui n'ont aucun enfant vivant sont ceux qui ont fait plus de fausses couches (Figures 47,48,51), ces résultats rejoignent ceux rapportés par la littérature. Ainsi, l'incidence des avortements spontanés varie selon la gestité, la parité et le nombre d'enfants vivants. Après trois avortements spontanés ou plus, la proportion de grossesses se terminant par un avortement spontané augmente à 44,6% chez les femmes nullipares et 35,4% chez les femmes multipares [Andersen et al., 2000].

Deux études ; l'une rétrospective et l'autre prospective [Regan et al., 1989; Nybo Andersen et al., 2000] ont montré que le risque de faire une nouvelle fausse couche augmente après chaque perte de grossesse, atteignant 45% après trois pertes de grossesse. L'augmentation du risque s'explique en partie par le fait que les couples qui ont fait une fausse couche ont tendance à multiplier leurs grossesses ultérieures à des âges progressivement plus tardifs [Rai et al., 2006].

L'histoire reproductive du couple s'avère un prédicteur indépendant de l'issue des futures grossesses. La primigravité et les femmes ayant des antécédents de naissances vivantes ont un risque moindre de fausse couche lors de leur prochaine grossesse que les femmes dont la grossesse s'est terminée par une FC [Regan et al., 1989]. Cependant, les femmes qui ont déjà eu des naissances vivantes ne sont pas à l'abri de faire des fausses couches récurrentes [Clifford et al., 1994 ; Brigham et al., 1999].

Plusieurs caractéristiques suggèrent que les FCR est une entité clinique bien distincte: le risque de fausse couche est directement lié aux résultats des grossesses précédentes [Risch et al., 1988 ; Nybo Andersen et al., 2000], et elles ont tendance à affecter les femmes à caractéristiques reproductives spécifiques [Strobino et al., 1986 ; Jivraj et al., 2001].

Dans une grossesse normale, la présence d'une activité cardiaque fœtale à l'échographie du 1^{er} trimestre est généralement rassurante, car le risque de perte spontanée est plus faible suite à cette étape gestationnelle [Brigham et al., 1999]. L'activité cardiaque a été retrouvée dans 48,92% des cas (68 grossesses) signalant l'évolutivité de la grossesse et 38,24% de ces grossesses ont évolué vers des FCS. L'étude du nombre de FCS en fonction de l'activité cardiaque a montré une différence significative ($p < 0,05$) (tableau 12). La plupart des rapports montrent que l'avortement avant 20 semaines est environ 2% dans le cas de fœtus avec activité cardiaque positive [Cashner et al., 1987; Mackenzie et al., 1988], tandis que le taux d'avortement spontané est d'environ 10 à 20% en cas de grossesse diagnostiquée. Ainsi, l'activité cardiaque détectée à l'échographie du 1^{er} trimestre pourrait être un bon indicateur de l'évolution de la grossesse.

Ces dernières années, avec l'avancée de la technologie échographique, y compris l'avènement des sondes endovaginales, l'activité cardiaque fœtale peut être confirmée à des âges gestationnels plus précoces [Goldstein et al., 1988]. Au tout début de la grossesse, le cœur du fœtus est créé et bat au 22^{ème} jour après la conception [Moore 1982]. Théoriquement, lors d'une échographie endovaginale, un pôle fœtal et un sac vitellin doivent être vus, si le sac gestationnel a un diamètre de 0,20 mm et l'activité cardiaque fœtale doit être visualisée si la longueur cranio-caudale est de 0,50 mm, c'est-à-dire après 6 semaines de gestation [Royal College of Radiologists and the Royal College of Obstetricians and Gynecologists Standing Joint Committee, 1995]. A l'échographie sus pubienne, ces caractéristiques ne peuvent être vues qu'une semaine plus tard. À l'heure actuelle, il n'y a aucune preuve claire que l'examen échographique pendant la grossesse est nocif [Neilson, 2001].

Bien que l'avortement spontané soit une complication commune de la grossesse, la mise en évidence d'une activité cardiaque fœtale au premier trimestre à l'aide de l'échographie, peut être considéré comme

un facteur pronostique de la grossesse. L'échographie en série permet, ainsi de distinguer le type de perte (grossesse arrêtée, œuf clair...) et démontrer que les avortements au stade embryonnaire sont plus courant que les avortements au stade fœtale. Dans le cas de la présente étude, les fausses couches ont intéressé beaucoup plus la phase fœtale de développement (53,13%) (Figure 51). D'autres études ont montré également qu'un sac gestationnel et une longueur cranio-caudale plus petits que prévu, ainsi que l'apparition retardée de l'activité cardiaque embryonnaire sont prédictifs d'une fausse couche [Bromley et al., 1991 ; Nazari et al., 1991 ; Dickey et al., 1994 ; Goldstein, 1992; Frates et al., 1993]. Des auteurs ont rapporté que les résultats échographiques ne peuvent pas prédire le caryotype des avortements spontanés [Coulam et al., 1997].

L'espacement des naissances est un élément important des conseils donnés aux couples en matière de procréation. Les couples qui ont eu une fausse couche doivent connaître le moment optimal pour concevoir afin d'avoir le meilleur résultat possible. Plusieurs recherches ont étudié, les effets de l'espacement des grossesses à divers niveaux, concernant la morbidité et la mortalité maternelle, ainsi que la santé et la mortalité néonatale et infantile [Rutstein et al., 2005, Conde-Agudelo et al., 2007]. Selon la présente étude, le délai intergénéésique (DI) en moyenne est de $8,2 \pm 1,13$ mois. Il est corrélé positivement à la parité et au nombre d'EV (tableau 32).

Les données de la littérature sont contradictoires à ce propos. Une étude a montré qu'un DI de moins de 6 mois n'est pas associé à une augmentation du risque de résultats obstétricaux indésirables après une FC en comparaison avec les grossesses retardées de plus de 6 mois. En fait, certaines preuves suggèrent que les chances d'avoir une naissance vivante, sont plus élevées, si le DI est moins de 6 mois [Kangatharan et al., 2017].

Il y a maintenant de nombreuses preuves suggérant que retarder une grossesse après une fausse couche n'est pas bénéfique, à moins qu'il n'y ait de raison spécifique. Les couples devraient être avisés de tenter une autre grossesse dès qu'ils se sentent prêts. Une autre étude a démontré le contraire. En effet, les femmes dont le DI est compris entre 15 et 75 mois ont une probabilité plus faible de fausses couches et de morti-naissances que celles avec des DI plus courts ou plus longs [Da Vanzo et al., 2007].

Da Vanzo et al (2007) ont trouvé que les DI courts sont associés à des taux plus élevés de mortalité infantile et juvénile, de décès maternel, d'hémorragie du troisième trimestre, de rupture prématurée des membranes, d'endométrite puerpérale et d'anémie. Certaines études ont également trouvé des effets délétères importants, dans le cas de très longs intervalles (environ >59 mois), particulièrement une augmentation du risque de mortalité maternelle, de pré-éclampsie et d'éclampsie. Cependant, il y a eu très peu d'études [Kallan, 1992 ; Kallan, 1997] sur l'espacement des grossesses affectant l'issue de la grossesse, qu'il s'agisse de naissance vivante, de mortinaissance ou de fausse couche. Une des raisons à cela est qu'il est beaucoup plus difficile de collecter des données fiables sur les grossesses n'aboutissant pas à une naissance vivante. Les informations concernant le DI et les autres données obstétricales pourraient aider le praticien à mieux adapter les conseils qu'il donnera aux couples, par exemple combien de temps ils

devraient attendre après une grossesse avant d'essayer une autre [Conde-Agudelo et al., 2005]. Cette notion semble être très importante et mérite d'être vérifiée par une étude plus large.

Bien que la majorité des avortements surviennent durant les premières semaines de la grossesse, alors que celle-ci n'est pas encore visible et qu'elle a souvent été gardée secrète, pour beaucoup de femmes. Ils représentent la perte d'un futur bébé et de tous les projets dont il était porteur. Ainsi, l'avortement spontané est une expérience qui peut être particulièrement difficile à vivre et en plus du chagrin lié à la perte, les études ont montré que pratiquement la moitié des femmes montrent une détresse psychologique significative, et notamment des symptômes anxieux, dépressifs ou un stress lié à l'événement [Athey et Spielvogel, 2000].

Ceci a bien été démontré par ce travail, tous les couples sans exception ont déclaré, avoir un trouble émotionnel à cause de ce problème (FCR). Les femmes semblent être les plus touchées (Tableau 10). En effet, l'expérience de vivre des fausses couches d'une façon répétitive, arrivant chez certains à 12 FCS et sans réussir à avoir un enfant vivant, aurait certainement un retentissement sur la vie psychologique des couples.

Reagan (2003) a mis en évidence que la représentation de la fausse couche a considérablement changé durant le XX^{ème} siècle et que la perte précoce d'une grossesse qui était auparavant due à la fatalité est maintenant devenue un drame personnel. Alors que l'avortement faisait autrefois partie de la vie des femmes et que le sentiment de fatalité gommait le chagrin [Laget, 1982], le deuil de «l'enfant précieux» d'aujourd'hui est certainement l'un des plus périlleux [Bacqué, 1995].

La signification de la fausse couche est historiquement et culturellement construite [Regan, 2003]. L'évolution de la société et le progrès de la médecine ont entraîné de nombreux bouleversements concernant la procréation et ont des conséquences sur le projet parental mais également sur la signification de la perte [Flis-Trèves, 2004]. Ainsi, du fait du développement des méthodes contraceptives, désirer un enfant devient alors une démarche consciente, raisonnable, délibérée, et voire même programmée [Bydlowski, 2002]. L'exercice de la responsabilité parentale est engagé très rapidement [Roegiers, 2003]. L'usage large de l'échographie a transformé le vécu de la grossesse et les découvertes quant à la morphologie du fœtus, ont invité les parents à nouer des relations avec leurs futurs bébés [Knibiehler, 1997]. En s'en préoccupant du tout début de la vie, la médecine a contribué à une personnalisation précoce du fœtus [Flis-trève, 2004]. Du fait de ces éléments, il semble particulièrement important de se pencher sur l'expérience des femmes au sujet de la fausse couche. Les attributions faites par les femmes à ce sujet sont reliées à l'intensité de la symptomatologie [Tunaley et al., 1993 ; Warsop et al., 2004] et plusieurs études ont mis en avant que les femmes qui se sentaient responsables de la FC avaient une détresse émotionnelle plus intense que les autres [Stirtzinger et al., 1999 ; James et Kristiansen 1995].

Malgré les avancées médicales et scientifiques, le sentiment de culpabilité persiste à la suite d'une fausse couche et il semble donc important de s'intéresser plus précisément aux facteurs qui y sont associés et aux

conséquences que celui-ci peut occasionner. Les femmes et leur partenaires ont également rapporté même d'une façon disparate que ce problème de FCR a retenti d'une façon négative sur le déroulement de leur vie conjugale au point de créer des conflits pouvant arriver jusqu'au divorce.

Le stress psychologique est également de plus en plus reconnu comme étant associé à des effets génomiques délétères, notamment un raccourcissement des télomères dans les cellules sanguines [Gouin et al., 2008; Damjanovic et al., 2007]. La question de savoir si la fréquence des Mnx dans les lymphocytes du sang périphérique est affectée par le stress psychologique mérite plus d'exploration [Fenech et Bonassi, 2011].

AVORTEMENTS SPONTANES PRECOCES A REPETITION ET ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES DES COUPLES

Cette étude est la première dans son genre dans notre contexte marocain, à étudier le lien entre les dommages de l'ADN dans les lymphocytes du sang périphérique et les complications de la grossesse (avortement précoce). Par conséquent, le but de cette recherche est d'évaluer le rôle de l'instabilité chromosomique des couples dans l'étiologie des avortements spontanés précoces à répétition.

De toutes les grossesses reconnues, environ 10 à 15% entraînent une fausse couche, comme il a été dit précédemment. La majorité des avortements spontanés surviennent au cours du 1^{er} trimestre et plus de 50% des ASP sont chromosomiquement anormaux [Kline, 1989 ; Chard, 1992]. Certains avortements spontanés surviennent très tôt, peu de temps après la fécondation, alors que la femme ne reconnaît même pas encore sa grossesse. Il semble important de rappeler qu'environ 10% du sperme et 20% des ovocytes sont chromosomiquement anormaux. Lorsque les gamètes anormaux sont impliqués dans la fécondation, on estime qu'environ 60% des grossesses sont perdues avant la fin du 1^{er} trimestre.

Les caryotypes parentaux font partie de l'évaluation des causes des FCR. Les réarrangements chromosomiques équilibrés sont courants chez les couples ayant eu des pertes de grossesses précoces récurrentes. Ces anomalies parentales sont également associées à des anomalies fœtales et ou à un retard mental. Le caryotype du produit d'avortement représente un examen de choix afin d'établir une étiologie de la fausse couche, cependant l'obtention d'une culture cellulaire peut s'avérer difficile compte tenu de :

- La qualité du produit de fausse couche recueilli;
- La possibilité d'une contamination maternelle du prélèvement qui n'est pas négligée ;
- Les échantillons pourraient ne montrer aucune croissance, car la mort intra-utérine est survenue bien avant que le tissu ne soit expulsé ou évacué ;
- Certaines cultures manquent de tissus embryonnaires ou fœtal ;
- Et enfin le risque de contamination bactérienne.

Cet examen, même s'il est de choix, il ne peut être réalisé que dans des conditions biologiques strictes (proximité du laboratoire de cytogénétique, conditions du recueil, etc...). Ces contraintes rendent cet examen difficilement réalisable en routine et ceci malgré son utilité majeure, raison pour laquelle, il est très courant de pratiquer le caryotype des parents plutôt que celui du produit de conception.

Le taux des anomalies chromosomiques dans la population générale est inférieur à 1% [Diejomaoh, 2015], alors qu'il est très élevé chez les couples ayant des FCR [Jauniaux et al., 2006]. Elles touchent 3 à 5% des couples souffrant de fausse couche à répétition [Carp et al., 2002]. Une possible explication est que ces anomalies résultent d'une forte instabilité chromosomique, ce qui peut être supposé à partir du taux élevé des cassures chromosomiques spontanées constatées chez ces couples [Turleau et al., 1979, Baltaci et

al., 1998]. Les couples étudiés ont présenté des moyennes à la fois du taux des aberrations chromosomiques ($p < 0,05$) et de l'indice de stimulation ($p < 0,001$) plus élevés avec une moyenne d'indice mitotique plus bas ($p < 0,001$) que celles des témoins (tableau 14). 16 couples soit 53,34% ont présenté des AC, ce taux reste très élevé par rapport à ce qui a été rapporté par la littérature [Jorde et al., 1995]. Nous émettons l'hypothèse que cette différence peut provenir de la constitution génétique des couples étudiés ou de la petite taille de l'échantillon. En effet, cette prévalence est largement supérieure à l'incidence des anomalies chromosomiques dans la population générale, communément estimée à 0,7% [Franssen et al., 2005].

Il existe une grande discordance entre les résultats des recherches, concernant les couples souffrant de pertes de grossesses répétées, elles rapportent une prévalence des anomalies chromosomiques parentales variant de 2,5 à 10,8% [Frikha et al., 2012 ; Goddijn, et al. ; Carp et al., 2004]. Plusieurs facteurs relatifs à la population étudiée (sa taille, l'âge parental, le mode de vie...) pourraient en être la cause, ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion. En effet, le nombre de couples étudiés est très variable allant pour certains auteurs de 107 à 4629 [Pasinska et al., 2005; Yu et al., 2002]; en plus, des travaux se sont intéressés aux troubles de la reproduction au sens large incluant la stérilité masculine et féminine autant que les avortements à répétition. Par ailleurs, la date d'échec de la grossesse ne fait pas l'unanimité, elle diffère d'une étude à une autre.

Certaines études ont inclu aussi bien les avortements spontanés précoces [Elghezal et al., 2007 ; Qian et al., 2005] que les avortements tardifs pour lesquels, souvent d'autres étiologies sont en cause [Celep et al., 2006]. En outre, certains couples ont été examinés à partir du deuxième avortement [Goddijn et al., 2004 ; Pasinska et al., 2005 ; Elghezal et al., 2007 ; Celep et al., 2006 ; Azim et al., 2003], d'autres à partir du troisième [Carp et al., 2004 ; Yuce et al., 2007]. Pour toutes ces raisons, la comparaison des résultats des différentes études reste difficile. Par ailleurs, l'incidence des aberrations chromosomiques est surestimée en cas d'association avec les autres étiologies d'avortement spontané, telles que les anomalies utérines et le syndrome des antiphospholipides, etc. [Stephenson et al., 2006]. Prenant en considération ces biais nos résultats montrent une incidence plus élevée en comparaison à ceux rapportés par la littérature dans le cas de deux accidents abortifs.

La répartition de l'âge chez les femmes est différente entre les femmes avec des anomalies chromosomiques et celles sans anomalies. Les patientes ayant des aberrations chromosomiques sont plus jeunes, leur moyen âge est de 30,2 ans. Cette catégorie de femmes ont l'IS et l'IM les plus bas par rapport aux femmes plus âgées ($p < 0,001$) (tableau 16). Il n'y avait pas de corrélation positive entre l'âge maternel avancé et le nombre d'avortements observés chez ces sujets. Il existe, en fait, une relation non linéaire entre l'âge maternel et la probabilité d'anomalie chromosomique [Franssen et al., 2005]. En effet, les AC surviennent le plus fréquemment chez des femmes jeunes, résultats uniques des disjonctions méiotiques ; en revanche, à un âge avancé, les femmes auraient plus d'accidents abortifs qui seraient dus à la conjonction de facteurs endocrinologiques plus qu'à des anomalies cytogénétiques [Pasinska et al., 2005].

Les hommes les plus jeunes ont la moyenne des AC la plus élevée ($p > 0,05$), leur âge moyen est de 33,88, ils ont affiché également l'IM le plus bas ($p < 0,01$) (tableau 17). Cette catégorie présente une instabilité chromosomique marquée, ainsi l'âge jeune ne constitue pas un facteur rassurant. L'exposition des couples à des agents toxiques iatrogènes causant ainsi des dommages chromosomiques, est un facteur indépendant de l'âge. En effet le mode de vie des hommes a été jugé malsain. 36,67% d'entre eux exercent l'agriculture comme profession, et utilisent régulièrement les pesticides dans leurs pratiques quotidiennes. Beaucoup d'études ont associé l'usage de ces produits et le risque de dommages d'ADN (AC).

Pour d'autres études, l'âge s'avère augmenter chez les hommes avec des anomalies chromosomiques [Celep et al., 2006]. Il s'agit probablement de la contribution d'aneuploïdies des spermatozoïdes ou d'erreurs de réplication de l'ADN, responsables de mutations lors de la division des spermatozoïdes [Dakouane et al., 2005]. Par ailleurs, l'incidence des maladies autosomiques dominantes de novo, dont certaines sont létales, est nettement associée au vieillissement [Godijn et al., 2004]. En effet, Dakouane a remarqué des altérations de l'histologie testiculaire chez les sujets âgés, en particulier un épaissement de la membrane des tubes séminifères ainsi qu'une diminution du nombre de cellules germinales et somatiques testiculaires [Dakouane et al., 2005]. Si la spermatogénèse peut être conservée sans risque chromosomique particulier, le risque mutagène reste, cependant, posé et serait la cause alternative des pertes fœtales (avortement spontané).

L'incidence des anomalies chromosomiques augmente progressivement avec le nombre de FCS, ainsi les couples qui ont eu plus d'accidents abortifs ($\geq 4FC$), ont le taux le plus élevé d'AC ($P < 0,05$) et de l'IS ($p < 0,01$) (tableau 20). Ces mêmes couples ont l'IM le plus bas ($p < 0,01$). Ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans la littérature. En effet, la prévalence des aberrations chromosomiques augmente au fil de la répétition des avortements chez les couples souffrant d'ASPR [Carp et al., 2004; El Ghazhel et al., 2007; Qian et al., 2005].

Le risque d'avortement spontané augmente avec le nombre d'avortements précédents; après un avortement, le risque moyen de récurrence est de 20%, après deux AS de 28%, après trois AS de 30% et de 45% après quatre. La probabilité d'avoir un enfant vivant diminue après chaque accident abortif, cette diminution est de 23% au-delà de trois avortements [Horne et Alexander, 2005]. En effet, le risque d'avortement spontané augmente avec :

- l'âge maternel ; après trois avortement spontané le risque est de 25% pour un âge moins de 30ans et il est de 52% pour un âge plus de 40ans ;
- le problème d'infertilité des couples;
- le nombre de grossesses (gravidité), quelle que soit l'aboutissement des grossesses antérieures : ainsi, on distingue en l'absence de naissance vivante antérieure, les ASR primaires et les ASR secondaires dans le cas contraire ; le taux de récurrence est d'environ 10% en cas d'accouchement entre les avortements spontanés.

Par ailleurs, des études antérieures ont montré que les taux de natalité diminuaient en fonction du nombre d'avortements spontanés [Carp H, et al., 2004]. Ces constats sont similaires à nos résultats, les couples qui ont eu un plus grand nombre de FCS dans leurs antécédents (≥ 4 FC), sont les plus à n'avoir aucun enfant vivant (Figure 50), ils affichent une instabilité chromosomique plus marquée (tableau 20).

Le nombre de FC est corrélé d'une façon très hautement significative à la gestité et au grossesses perdues en période périnatale (Tableau 23). Ceci confirme l'augmentation d'accidents abortifs avec la gravidité des couples et que les couples qui font des FCR sont aussi plus à risque de faire des accidents périnataux. Osborn et ses collaborateurs (2000), ont rapporté également que le risque d'avortement spontané est excessivement élevé chez les femmes à forte gravidité.

Il ressort de cette étude que les couples qui sont multigestes et nullipares ont plus d'anomalies chromosomiques AC ($p < 0,05$) et les moyennes d'IS et d'IM les plus basses ($p < 0,001$) (tableaux 18,19). Ces deux classes de couples ont plus de dommages chromosomiques qui retentissent négativement sur leur vie reproductive (FC). Ainsi devant des accidents obstétricaux répétés (FC), il faut penser à consulter et à faire une exploration cytogénétique, plutôt que de multiplier les grossesses.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a constaté que dans 20% des cas d'échec de la reproduction, le problème était principalement masculin, dans 38% des cas le problème était à prédominance féminine, 27% des anomalies ont été liées aux deux partenaires, et dans les 15% restants aucune cause n'a été définie [OMS, 1987]. En général, les femmes ont une incidence plus élevée d'anomalies chromosomiques que les hommes. En fait, ces anomalies provoquent l'infertilité masculine en empêchant la spermatogenèse. En revanche, l'ovogenèse est préservée, mais les gamètes résultants peuvent être porteurs d'anomalies chromosomiques déséquilibrées [Elghezal et al., 2007]. Ce constat est similaire au notre, la moyenne du taux des AC des femmes est plus supérieure à celle des hommes ($p < 0,05$), avec un IS plus élevé ($p < 0,001$) et un indice mitotique plus bas ($p < 0,001$) (tableau 15). Dix femmes et huit hommes ont des anomalies chromosomiques, avec un rapport de 1,25. Un rapport femme/homme similaire a été trouvé dans la plupart des études rapportées dans la littérature. Pour deux couples (12,5%), les femmes et leurs partenaires sont porteurs d'AC. Aucun cas similaire n'a été trouvé dans la littérature, toutes les études ont rapporté que seulement l'un des deux partenaires est porteur d'AC, c'est dire l'intérêt de l'étude cytogénétique des deux partenaires à la fois.

Le risque d'avortement dépend du contexte primaire ou secondaire de la perte fœtale. Il faut toujours donner plus d'importance à la gravidité et à la parité des couples à chaque fois qu'il y a des difficultés dans la reproduction (avortement). Cette étude a démontré que les couples non porteurs d'AC ont de forte chance de réussir leurs grossesses par rapport aux couples porteurs d'AC (tableau 13).

Les couples qui n'ont aucun accident obstétrical (MFIU, décès neonatal, mort né) au cours de la période périnatale affichent un taux d'AC plus bas ($p < 0,05$) et des indices mitotiques et de stimulation plus élevés (tableau 22) par rapport à ceux qui ont eu au moins une GP en périnatale. Il existe également une

corrélation positive très significative entre le nombre de FC et les grossesses perdues en périnatale. Ceci suggère que ces couples qui ont une génotoxicité élevée font aussi bien des accidents obstétricaux précoces (FC) que tardifs. L'analyse en composante principale (ACP) (Figure 119) a également noté une affinité entre le taux des AC, le nombre de grossesse (gestité), les grossesses perdues en périnatale et le nombre de FCS. Ainsi, les couples porteurs d'AC font plus de fausses couches à répétition, et restent toujours susceptibles à faire des accidents obstétricaux en période périnatale. Ces accidents obstétricaux aboutissent à l'équilibre génétique dans l'espèce humaine par le biais de la sélection naturelle. Ces résultats nous amènent à penser à proposer une étude cytogénétique à tous les parents présentant de tels accidents.

Parmi les couples étudiés, seulement six (06) ont eu des enfants phénotypiquement normaux soit 20%, avant leurs échecs de procréation. La fréquence des aberrations chromosomiques est de 50%, soit 3/6.

Par conséquent, la présence d'enfant vivant n'exclut pas la possibilité d'une anomalie chromosomique chez les parents ; cependant, le pronostic peut être meilleur. Par ailleurs, 04 couples, avaient des antécédents d'enfants malformés (CIV, Omphalocèle, hydrocéphalie). Parmi eux, un couple (25%) est porteur d'anomalies chromosomiques. Ce genre de malformation est reconnu être lié à des anomalies chromosomiques.

Ainsi, avoir un enfant malformé, constitue un facteur de mauvais pronostic, qui affecte négativement les résultats obstétricaux ultérieurs, incitant un diagnostic prénatal précoce. Ceci afin d'éviter la naissance de nouveau-nés malformés, porteurs d'anomalies chromosomiques.

Les couples qui n'ont pas réussi à avoir un enfant vivant ont plus d'AC ($p < 0,05$), un indice de stimulation plus élevé ($p < 0,001$) et un indice mitotique plus bas ($p < 0,001$) par rapport à ceux qui ont eu au moins un EV (tableau 21). Cependant, plus de la moitié des couples (56,25%) porteurs d'AC ont réussi à avoir au moins un enfant vivant. Le risque de donner naissance à des enfants viables présentant des anomalies chromosomiques est faible chez les couples porteurs d'AC et souffrant de fausses couches à répétition. Leurs chances d'avoir un enfant vivant sont aussi élevées que les couples non porteurs, malgré un risque plus élevé de fausse couche [Franssen et al., 2006].

La naissance d'enfant normal ou anormal conduit à un comportement différent des parents par rapport à leur suivi médical ainsi qu'au risque éventuel d'anomalie chromosomique :

- La présence de descendance anormale, constitue un facteur alarmant pour les parents, qui les pousse à consulter tôt et à réaliser un caryotype et un suivi génétique.
- L'absence de descendance anormale pourrait faussement retarder la consultation de cytogénétique, et la réalisation des explorations nécessaires. Ainsi, la présence de descendance normale constitue un facteur rassurant pour les parents.
- par ailleurs, le caractère primaire des avortements spontanés, assombrit le pronostic obstétrical.

AVORTEMENTS SPONTANES PRECOSES A REPETITION ET FREQUENCE DES MICRONOYAUX

Le test des micronoyaux a été utilisé comme un moyen de dépistage sensible pour évaluer le risque génotoxique dans les populations. Les micronoyaux sont produits pendant la mitose par divers mécanismes (fragments acentriques, chromosome multicentrique, kinétochores endommagés, défauts des fibres du fuseau). Ils peuvent être détectés dans le cytoplasme proche du noyau sous forme de petites particules semblables à un noyau [Muller et Streffer, 1994].

Les variations interindividuelles peuvent s'expliquer par le style de vie, y compris les expositions environnementales ou les facteurs de sensibilité individuels [Huber et al., 1992, Koteles et al., 1993]. L'analyse des dommages de l'ADN dans les lymphocytes du sang périphérique au niveau moléculaire et chromosomique a été acceptée comme une technique de surveillance biologique des événements génotoxiques dans les cellules somatiques depuis le début des années 1970 [Srb et Puza, 1975].

Les lymphocytes circulent continuellement dans tout le corps éprouvant un déséquilibre physiologique et nutritionnel dans les tissus. Ainsi, les dommages de l'ADN à leur niveau témoignent d'une instabilité génomique héritée ou acquise [International Atomic Energy Agency, 2001]. Les dommages de l'ADN sous forme de micronoyaux (MN) dans les lymphocytes périphériques humains mesurés à l'aide du test des micronoyaux sont reconnus comme un biomarqueur précieux pour étudier l'effet génotoxique des facteurs environnementaux, génétiques et alimentaires. Il a été validé et standardisé à un niveau international [Albertini et al., 2000 ; Bonassi et al., 2001]. Il est considéré comme le plus robuste, ainsi que le plus couramment utilisé, comme méthode de mesure de dommages d'ADN dans les lymphocytes humains en culture.

Des études antérieures ont montré qu'une fréquence élevée de MN dans les lymphocytes, est prédictif d'un risque accru de cancer [Bonassi et al., 2005 ; Rossner et al., 2005], de maladies cardiovasculaires [Federici et al., 2008] et a été associée à des maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson [Federici et al., 2008 ; Migliore et al., 2001]. Deux autres études ont montré que les dommages chromosomiques, tels qu'évalués par la fréquence de MN, sont augmentés chez les couples infertiles et chez ceux qui ont eu l'expérience de FCR par rapport aux couples fertiles [Trkova et al., 2000 ; Furness et al., 2008].

La distribution et la fréquence des micronoyaux (MN) dans les lymphocytes des couples ayant eu des ASPR et celles des témoins sont résumées dans le (tableau 14) et illustrées dans la figure 53. La fréquence des MN chez ces couples est statistiquement plus élevée ($P < 0,001$) par rapport aux témoins. De même, les couples qui ont fait plus d'accidents abortifs ($\geq 4FC$) sont les couples qui ont la moyenne de fréquence la plus élevée des micronoyaux ($p < 0,001$) (tableau 20). Une corrélation positive significative ($p < 0,05$) lie la fréquence des micronoyaux au nombre de fausses couches (tableau 23). Ces mêmes couples ($FC \geq 4$) ont la moyenne de l'IP la plus basse avec une différence très hautement significative (tableau 20). Les dommages chromosomiques

dont ils souffrent induisent un ralentissement probable de la division cellulaire. En effet, l'indice de prolifération cellulaire (IP) est couramment utilisé en tant que paramètre de mesure de la cytotoxicité [Al-Zubairi et al., 2010]. Sa diminution renvoie vers une cytotoxicité mortelle probable.

Nous considérons, comme le cas d'autres études [Feneche et al., 1994; Natarajan et al., 1996] qu'une fréquence élevée des micronoyaux est la preuve directe de dommages chromosomiques. Ainsi, nous confirmons l'augmentation significative de l'instabilité chromosomique chez les patients souffrant d'au moins deux avortements précoces dans leurs ATCDS. Ces résultats obtenus corroborent ceux d'autres études qui suggèrent qu'une fréquence élevée de Mnx dans les lymphocytes mesurée à l'aide du test des micronoyaux est associée à un risque accru de FCR. En effet, un nombre élevé de Mnx est associé à des complications de la grossesse (FC) [Olivera et al., 2003; Fenech, 2011].

Trkova et ses collaborateurs (2000), ont également constaté que les couples souffrant de FCR ont une fréquence plus élevée de lésions chromosomiques (MN) dans leurs lymphocytes en comparant avec des couples fertiles ayant eu une grossesse normale. Ils ont trouvé une fréquence significativement plus élevée des Mnx chez les personnes infertiles et ayant eu des avortements spontanés récurrents par rapport aux témoins à la fois lorsque les données de chaque membre du couple ont été analysées séparément ainsi que lorsque les fréquences des Mnx des couple ont été combinées [Trkova et al., 2000].

Il a été démontré qu'au cours du développement fœtal, la prolifération cellulaire rapide, la transcription du gène actif et le taux élevé du métabolisme de l'ADN ; tous nécessaires pendant l'organogénèse des principaux systèmes organiques ; pourraient augmenter les effets génotoxiques et la susceptibilité aux agressions du génome [Vinson et Hales, 2002]. Les dommages du génome peuvent survenir via une variété de mécanismes, y compris des mutations ponctuelles, des modifications de base, des cassures chromosomiques, des réarrangements chromosomiques et des pertes chromosomiques ou des gains [Fenech, 2005]. L'augmentation des dommages de l'ADN au niveau moléculaire et au niveau chromosomique a été associée à l'infertilité [Trkova et al., 2000; Sankof et al., 2002] et à la survenue de fausse couche récurrente [Warren et Silver, 2008].

Le présent travail a mis en évidence une fréquence élevée des micronoyaux et un indice de prolifération plus bas en particulier chez les couples qui :

- ❖ n'ont aucun enfant vivant ($p < 0,01$) ;
- ❖ sont nullipares ($p < 0,001$);
- ❖ sont multigestes ($p < 0,001$) ;
- ❖ et chez ceux qui ont perdues plus d'une grossesse en période périnatale ($p < 0,01$).

Ces données convergent vers le fait que les couples souffrant d'un mauvais résultat obstétrical (ASR, aucun enfant vivant, nulliparité, plus de grossesses perdues en période périnatale), ont une instabilité chromosomique plus manifeste. En réponse à ce mauvais résultat, ces couples multiplient leurs grossesses

(multigestité) dans l'espoir de l'améliorer. Ces constats rejoignent ceux de Govindaiah (2008) qui a montré que les dommages chromosomiques tels qu'évalués par la fréquence des Mnx, sont augmentés chez les couples infertiles et chez ceux qui ont fait des ASR par rapport aux couples fertiles.

La fréquence des Mnx peut être un marqueur pronostique de la grossesse. Elle fournit un indice d'instabilité génomique des tissus parentaux et/ou fœtaux, soit en raison de facteurs héréditaires prédisposant à l'instabilité génomique ou en raison d'insuffisance nutritionnelle ou d'exposition environnementale à des facteurs génotoxiques causant des dommages au génome.

Une étude de Levario-Carillo (2005) a évalué la formation des Mnx dans le sang du cordon ombilical et a démontré que la fréquence des Mnx chez les mères était corrélée à celle de leurs bébés, soutenant la validité de l'utilisation de la fréquence des Mnx dans lymphocytes maternels pour estimer le risque génotoxique chez le fœtus.

L'étude a révélé que les femmes ont le taux le plus élevé des micronoyaux ($p < 0,01$) par rapport aux hommes. Elles ont également affiché le taux le plus bas de l'IP ($p < 0,001$), ce qui suggère que les femmes sujettes de l'étude soit :

- ont une susceptibilité génétique accrue au stress génotoxique ;
- sont excessivement exposées aux génotoxines environnementales ;
- présentent des carences en facteurs alimentaires spécifiques ce qui pourraient augmenter leur sensibilité à l'instabilité génomique ;
- ou bien ont un déficit dans la réparation des dommages auxquels elles sont exposées.

L'effet du vieillissement et du sexe sur la fréquence des MN dans les lymphocytes sanguins était le premier reconnu dans les études réalisées par Fenech et Morley au milieu des années 1980 et par Fenech au début des années 1990 [Fenech et Morley, 1985 ; Fenech et al., 1994]. Depuis lors, plusieurs autres laboratoires dans le monde ont constamment montré que la fréquence des Mnx dans les lymphocytes augmente régulièrement avec l'âge chez les deux sexes à partir de groupes d'âge très jeunes. Une méta-analyse des données du monde entier a été coordonnée par le Projet HUMN et a confirmé que la cohérence de ces observations est statistiquement significative [Bonassi et al., 2001]. L'augmentation des Mnx avec l'âge est probablement due à une combinaison de facteurs comprenant :

- (i) l'effet cumulatif des mutations dans les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, la ségrégation du chromosome et le point de contrôle du cycle cellulaire ;
- (ii) les anomalies chromosomiques de nombre et de structure causées par l'exposition aux génotoxines endogènes, une nutrition inadéquate, l'exposition à des génotoxines environnementales ou professionnelles, ainsi qu'à d'autres facteurs liés au mode de vie.

Dans notre contexte la fréquence des micronoyaux est augmentée chez les sujets jeunes (hommes et femmes) ($p < 0,001$), ce constat peut être dû en partie à la petite taille de l'échantillon. Ces études ont également montré, comme le cas de la notre, que la fréquence des Mnx avait tendance à être plus élevée

chez les femmes que chez les hommes. Cela peut être expliquée par la plus grande tendance du chromosome X à être perdu en tant que MN par rapport aux autres chromosomes et au fait que les femmes ont deux copies de chromosome (X) contre un seul chez les hommes [Tucker et al., 1996 ; Norppa et Falck, 2003].

Les couples et en particulier les femmes qui développent des complications liées à la grossesse sont plus susceptibles d'avoir des dommages chromosomiques dans leurs lymphocytes. Si de tels événements surviennent aussi au niveau des cellules trophoblastiques, il est possible que des modifications des gènes en raison des dommages de l'ADN (formation des Mnx) et l'expression génique anormale qui en résulte, puissent affecter le phénotype des cellules trophoblastiques et le potentiel prolifératif provoquant des anomalies de la placentation.

Au cours des premières étapes de la placentation, les cellules natural killer (NK) de l'utérus s'accumulent sous forme d'infiltrat dense autour des cellules trophoblastiques envahissantes et affectent à la fois l'invasion trophoblastique et les modifications vasculaires du lit placentaire maternel [Sibai et al., 2005]. Hypothétiquement, les dommages de l'ADN dans les cellules NK et le cytotrophoblaste pourraient nuire à leur fonction, à leur viabilité, à leur prolifération, et modifier ainsi le processus de placentation et augmenter le risque de complication de la grossesse.

L'augmentation de l'instabilité du génome des lymphocytes circulants peut refléter un problème systémique qui pourrait être observé dans d'autres tissus, compte tenu de l'association de la fréquence des Mnx dans les lymphocytes avec l'hypertension [Schupp et al., 2007], les maladies cardiovasculaires [Federici et al., 2008 ; Botto et al., 2001] et le risque de cancer [Bonassi et al., 2007 ; Murgia et al., 2008]. De plus, une autre étude a montré que la fréquence des Mnx et l'aneuploïdie étaient légèrement augmentées dans les lymphocytes des femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques et étaient également corrélées à la résistance à l'insuline [Moran et al., 2008].

Les biomarqueurs des dommages génomiques fournissent un indice des dommages accumulés survenus pendant la durée de vie des lymphocytes (demi-vie de 6 mois), comme étant un marqueur des dommages du génome hérités ou acquis [International Atomic Energy Agency, 2001].

Plus de la moitié (63,1%) des femmes de l'étude ont déclaré avoir reçu un traitement à base de la progestérone durant leur premier trimestre de grossesse. Il existe une différence très hautement significative ($p < 0,001$) entre le nombre de FC et le traitement reçu au 1^{er} trimestre de grossesse (progestérone) (tableau 12). Une étude a mesuré la fréquence des MN dans les lymphocytes maternels pendant la 7^{ème} et la 8^{ème} semaine de gestation pour tester l'effet de la progestérone, sur l'issue de la grossesse [Milosevic-Ethordevic et al., 2003]. Les résultats de cette étude ont démontré que l'augmentation des doses thérapeutiques de la progestérone est associée à une augmentation des dommages de l'ADN (fréquence MN). Ce constat devrait être vérifié par une étude plus détaillée, vu l'usage large de ce traitement dans la prise en charge des menaces d'avortements.

L'alimentation maternelle est l'un des principaux facteurs influençant le processus de développement du fœtus et soutient le taux élevé de prolifération cellulaire et de réplication de l'ADN qui se déroulent pendant la grossesse [Maloney et Rees, 2005]. Le régime alimentaire est aussi un facteur clé pour déterminer la stabilité génomique, il affecte toutes les voies de développement, à savoir l'activation/la désintoxication de produits chimiques empêchant l'oxydation, la réparation, l'apoptose et la synthèse de l'ADN [Fenech, 2001].

Les études futures auraient besoin de se concentrer sur l'étude de la fréquence des Mnx chez les couples souffrant de d'ASPR et qui sont en carence en micronutriments, ce qui pourrait affecter le maintien et la ségrégation des chromosomes [Fenech, 2007 ; Fenech et al., 2005]. Une carence probable en folate et en vitamine B12, peut provoquer une hypométhylation de l'ADN, un défaut qui conduit à une perte chromosomique et à une mauvaise ségrégation. De nouvelles preuves suggèrent que l'utilisation de vitamines en prénatale contenant des micronutriments avant et pendant la grossesse peut être associée à une réduction du risque d'anomalies congénitales, d'accouchement prématuré, de faible poids à la naissance et de prééclampsie (PE) [Scholl, 2008].

Un biomarqueur prédictif, tel que la fréquence des Mnx dans les lymphocytes, peut être utile pour étudier l'effet de la supplémentation en micronutriments sur la stabilité du génome. Il y a 40 micronutriments essentiels nécessaires à l'alimentation humaine, de nombreux sont cruciaux pour déterminer la stabilité génomique [Fletcher et Fairfield, 2002]. Ceci suggère la nécessité de poursuivre les études qui tiennent également compte de l'effet de facteurs alimentaires, y compris les polymorphismes des gènes impliqués dans la synthèse et la réparation de l'ADN, comme ceux impliqués dans le métabolisme du carbone [Furness et al., 2008 ; Umegaki et Fenech, 2000 ; Botto et al., 2003], lors de l'étude de la relation entre les lésions chromosomiques et l'issue de la grossesse.

Un autre mécanisme qui pourrait expliquer l'augmentation du niveau des Mnx dans les lymphocytes des couples souffrant de FCR est le stress oxydatif placentaire [Sacks et al., 1998]. Il peut être dû à un remodelage de l'artère spiralee conduisant à un trouble de l'équilibre ischémie/reperfusion, qui déclenche une réponse inflammatoire et la génération d'espèces réactives de l'oxygène, qui peuvent induire des cassures chromosomiques et la formation de Mn [Cindrova-Davies 2009]. L'augmentation de la fréquence des Mnx peut être également dû à une exposition excessive à diverses génotoxines environnementales [Roubicek et al., 2007], les rayonnements ionisants [Fenech et Morley, 1986 ; Song et al., 2008] et le métabolite cancérigène de l'alcool acétaldéhyde [Maffei et al., 2000 ; Ishikawa et al., 2007].

Dans le présent travail, nous n'avons pas testé la relation des dommages de l'ADN lymphocytaire avec ceux du placenta ou du fœtus. Cependant, la plausibilité d'une association entre les dommages de l'ADN maternel et les dommages de l'ADN transplacentaire chez le fœtus est soutenue par l'augmentation des adduits des Mnx et de l'ADN lymphocytaire du sang périphérique maternel et du sang du cordon dans diverses expositions environnementales aux génotoxines [Levario-Carrillo et al., 2005 ; Pedersen et al., 2009 ; Arab et al., 2009].

L'une des lacunes les plus surprenantes est le manque d'études et de données sur l'association de l'expression des Mnx chez la mère, le père et le risque de trouble de développement chez leur bébé. La plausibilité de telle association est élevée parce que la plupart des facteurs tératogènes classiques connus, tels que la carence en folates (anomalies du tube neural) et les rayonnements ionisants (multiples anomalies du développement), sont également des inducteurs puissants de la formation des Mnx dans les cellules humaines [Fenech et al., 2010].

Actuellement, les femmes à risque de complications de grossesse sont identifiées sur la base du risque épidémiologique et des facteurs cliniques. Il n'y a pas de test fiable disponible assez tôt en préconceptionnel pour les identifier et permettant ainsi, des interventions préventives. Une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents de la perte fœtale précoce (ASP) n'améliorera pas seulement l'identification des sujets à risque mais pourrait également permettre une prévention plus efficace.

Parmi les faiblesses de cette étude est la petite taille de l'échantillon, d'où la nécessité de vérifier ces observations dans une deuxième cohorte indépendante et plus importante. Idéalement, des études futures pourraient également mesurer les dommages de l'ADN directement dans le trophoblaste et vérifier que les dommages de l'ADN mesurés dans les lymphocytes sont corrélés aux dommages de l'ADN dans le placenta. Par ailleurs, les études de cohortes plus importantes qui ne discriminent pas les participants en fonction de leurs facteurs de risque sont nécessaires pour obtenir une évaluation plus objective de la pratique d'utilisation des Mnx comme marqueur prédictif des pertes précoces de grossesse (ASP).

AVORTEMENTS SPONTANES PRECOSES A REPETITION ET ECHANGES ENTRE LES CHROMATIDES SŒURS

En plus de l'étude des aberrations chromosomiques et de la fréquence des micronoyaux, nous avons opté également pour l'étude des échanges entre les chromatides sœurs (ECS) pour détecter les dommages de l'ADN chez les couples souffrant d'ASPR.

Le test des échanges entre les chromatides soeurs dans les chromosomes métaphasiques [Latt,1973] a été adopté comme un des tests d'évaluation de génotoxicologie et de mutagénicité, étant un indicateur potentiellement sensible de dommages cellulaires. Les ECS ont été définis comme l'échange de produits de réplication de l'ADN à des locus chromosomiques apparemment homologues[Latt et Skreck, 1980]. Ils peuvent être détectés comme des zones d'intensité de coloration réciproque des chromosomes dans les cellules en métaphase qui ont été répliqués en présence de 5-bromo-2'-désoxyuridine (Brd-Urd) [Wolf et Perry, 1976].

Les résultats ont montré une augmentation du taux des ECS et une diminution de l'IR des couples étudiés par rapport aux témoins ($p < 0,001$) (tableau 14). Les ECS augmentent avec le nombre de fausses couches et les couples qui ont eu plus d'accidents abortifs ($\geq 4FC$) ont la moyenne la plus supérieure des ECS ($p < 0,05$) et l'indice de réplication la plus basse ($p < 0,01$) (tableau 20).

Certaines études n'ont pas trouvé de différence de fréquence des ECS chez les femmes ayant des antécédents de fausse couche à répétition en comparaison avec les témoins [Stephano et Roberto, 1999]. En revanche, Ghosh et Ghosh, (1988) ont signalé une augmentation significative de la fréquence des ECS pendant la grossesse. La concentration des œstrogènes est augmentée au cours de la grossesse, ce qui peut être la raison possible d'une augmentation des ECS [Sharma et Das, 1983]. D'autres études antérieures ont démontré que le potentiel génotoxique des stéroïdes provoque des lésions chromosomiques, une induction des ECS et la formation d'adduits endogènes [Joosten et al., 2004].

Les femmes ont la moyenne la plus élevée du taux des ECS et la moyenne la plus basse de l'IR par rapport aux hommes avec une différence très hautement significative ($p < 0,001$) (tableau 15). 86,7 % d'entre elles ont déclaré avoir utilisé une contraception orale comme méthode contraceptive pour une durée moyenne de 31 mois. Le délai moyen entre l'arrêt de la CO et la grossesse est de 1,96 mois. Par ailleurs, une différence significative s'est révélée entre la prise de CO avant la survenue de FC et le nombre de FC (tableau 12). La comparaison entre le délai moyen d'arrêt de la CO entre les grossesses qui ont évolué vers des accouchements et celles qui ont été perdues sous forme de FCS, a montré que ce délai est plus court pour les grossesses qui ont donné des FCS ($p < 0,05$) (tableau 11). Ceci pourrait expliquer la persistance des effets génotoxiques des CO, et aurait un effet négatif sur l'évolution de la grossesse (FC). Falaq et al (2012) ont rapporté une augmentation significative de la fréquence des ECS chez les femmes sous contraceptifs oraux qui peut être dû aux nouveaux constituants hormonaux, développés dans le but de réduire les effets indésirables des contraceptifs, comme la réduction de la teneur en œstrogène. La conversion des

œstrogènes en œstrogènes catécholiques et en quinines, via des réactions redox provoque des dommages oxydatifs de l'ADN [Siddique et al., 2005].

Il existe des rapports positifs et négatifs concernant les effets génotoxiques des œstrogènes et des progestatifs synthétiques [Dhillon et al., 1994]. Les ECS sont la manifestation cytologique des échanges entre les produits de réplication de l'ADN à des locus apparemment homologues. C'est un indicateur sensible des effets génotoxiques par rapport aux aberrations chromosomiques [Tucker et Preston, 1996]. Le potentiel génotoxique des stéroïdes est déterminé par les conditions du métabolisme dans le système d'essai et le corps humain. L'extrapolation des données expérimentales sur l'Homme est non seulement difficile mais également complexe.

Les classes d'âge maternel et paternel les plus jeunes, ont les moyennes les plus supérieures des ECS ($p < 0,001$) et les moyennes les plus basses de l'IR ($p < 0,001$) (tableau 16,17)). Ces résultats témoignent que c'est deux classes les plus touchées par les dommages chromosomiques mesurés par le biais de ce test. L'étude des ECS en fonction des données obstétricales, a montré que les couples mutigestes, nullipares, ainsi que ceux qui n'ont aucun enfant vivant et ceux qui ont perdu plus d'une grossesse en période périnatale ont les moyennes les plus élevées des ECS ($p < 0,001$) et les plus basses de l'IR.

Bien que la relation entre la mutagénèse et la fréquence des ECS reste obscure, il est bien connu que l'exposition du fœtus vulnérable à des agents endommageant l'ADN peut entraîner des anomalies congénitales ou même une perte fœtale [Kram et al., 1979]. Il semble également que l'exposition des femmes à ces agents augmente la fréquence des ECS chez leurs nouveau-nés [Funes-Cravioto et al., 1977]. En outre, des taux élevés des ECS ont été rapportés chez les nourrissons présentant une anomalie congénitale du tube neural [Seshardi et al., 1982] et chez les patients atteints du syndrome de Down [Shubber et al., 199].

La question soulevée jusqu'ici est de savoir si la fréquence des ECS plus élevée chez ces couples est induite par leur exposition à des agents environnementaux dangereux, ou est constitutionnellement déterminée, un point qui nécessite des éclaircissements grâce à des investigations complémentaires.

L'étude à la fois des aberrations chromosomiques, la fréquence des micronoyaux et les ECS dans les lymphocytes humains en culture fournit un indice de dommages génétiques survenant pendant la durée de vie de ces cellules [Koteles et al., 1993]. Considérant que les variations interindividuelles pourraient être dues à différents facteurs liés au mode de vie, y compris les expositions environnementales ou à des facteurs de susceptibilité inter-individuelle. Des études précédentes ont montré que chez différentes personnes traitées avec la même dose de mutagène, le niveau d'aberration chromosomique était différent, ce qui peut être expliqué par la réactivité individuelle. Aussi la sensibilité individuelle au mutagène est augmentée en raison de la différence de l'activation métabolique du mutagène et l'efficacité de la réparation de l'ADN [Siddique et al., 2005].

Dans la grande majorité des études publiées, des fréquences plus élevées des Mnx, d'AC et d'ECS ont été trouvées dans les populations exposées à des agents génotoxiques [Migliore et al., 1991 ; Botta et al., 1996 ; Augusto et al., 1997]. Ainsi, nous pouvons supposer que les couples souffrant d'ASPR et qui ont des niveaux élevés des Mnx, des AC et des ECS ont été exposés à des agents mutagènes ou que leurs mécanismes de réparation d'ADN étaient déficients.

Bien que l'analyse des biomarqueurs (AC, IM, IS, Mn, IP, IR et ECS) de génotoxicité soit un moyen sensible pour détecter les dommages de l'ADN, il faut dire avant que les individus avec des taux élevés d'AC, de Mn et d'ECS sont plus susceptibles à avoir une perte fœtale ou une progéniture anormale. Le manque des informations publiées dans ce domaine justifient la nécessité d'études complémentaires pour justifier l'inclusion de ces tests parmi les différents tests réalisés par les couples souffrant de trouble de la reproduction (ASPR). Ainsi, une étude plus large de ces couples, avec plus de détails sur leurs antécédents, leur mode de vie, avec un suivi plus long et des examens cytogénétiques répétés pourraient éventuellement aider à une meilleure maîtrise du sujet.

Les limites de l'étude

Comme toute étude, la notre a également ses limites, qu'on peut résumer dans les principaux points suivants :

- ✓ La petite taille de l'échantillon;
- ✓ l'absence de cas témoins originaire de la même région, n'ayant aucune fausse couche dans leurs ATCDS, et ayant un bon résultat obstétrical (enfants vivants) ;
- ✓ L'analyse cytogénétique réalisée sur les cellules somatiques pourrait être un mauvais indicateur des dommages possibles de la lignée germinale.

**PRISE EN CHARGE CYTOGENETIQUE DES COUPLES
SOUFFRANT D'AVORTEMENTS SPONTANES PRECOSES A
REPETITION**

PRISE EN CHARGE CYTOGENETIQUE DES COUPLESSOUFFRANT D'AVORTEMENTS SPONTANES PRECOES A REPETITION

1 INTRODUCTION

Le diagnostic étiologique des avortements spontanés à répétition pose des problèmes souvent difficiles à résoudre. Les anomalies chromosomiques parentales constituent une possibilité étiologique assez particulière, car elles conduisent à une prise en charge médicale avec un conseil génétique et un diagnostic prénatal voire préimplantatoire. Elles sont caractérisées par leur association à un risque accru de fausse couche et à une diminution des chances de naissances vivantes [Carp et al, 2004] qui sont fortement liées au type de l'anomalie. C'est ainsi que le caryotype parental est d'un grand intérêt, est-ce dès la deuxième fausse couche.

2 ETUDE CYTOGENETIQUE DU PRODUIT DE CONCEPTION

Bien qu'une étude complète d'une fausse couche nécessite de nombreux tests et examens complémentaires, y compris des tests cytogénétiques, ces tests sont très onéreux et de pratique difficile, et les études cytogénétiques ne peuvent tout simplement pas être réalisées pour chaque perte de grossesse. Cependant, les tests cytogénétiques du produit de conception sont souvent utiles. Tous les produits de conception doivent être soigneusement examinés pour rechercher des signes de malformations congénitales. Les grossesses présentant des malformations et un retard de croissance sont plus susceptibles d'avoir des anomalies chromosomiques. La distinction entre une fausse couche chromosomiquement normale ou non est d'une grande utilité pour la prise en charge des couples car elle permet de déterminer, la nécessité de d'autres examens supplémentaires de prédire le risque de récurrence.

Un couple ayant fait une fausse couche chromosomiquement anormale est plus à risque de présenter à nouveau une grossesse ultérieure avec un caryotype anormal, alors que dans le cas contraire, il est plus susceptible d'avoir un caryotype normal lors d'une grossesse ultérieure. [Hassold, 1980 ; Warburton et al., 1987 ; French et Bierman, 1962]. Les tests cytogénétiques sont particulièrement utiles en cas de perte de grossesse suspectée avoir des anomalies cytogénétiques. Le risque d'aberrations chromosomiques est également élevé en cas d'un état d'anasarque fœtale, de macération ou d'échec de grossesse antérieure [Mueller et al., 1983]. Dans tous les cas où aucune explication de la perte fœtale n'a été établie, des études cytogénétiques devraient probablement être réalisées. D'autre part, de nombreux couples souffrant d'ASPR, trouvent que la recherche d'une réponse à leur perte de grossesse doit commencer un peu plus tôt est ce dès le deuxième accident abortif.

Malgré les avancées considérables dans le domaine de la procréation médicalement assistée d'une part et la compréhension des mécanismes physiopathologiques liés aux échecs de la grossesse d'autre part,

beaucoup d'informations sont encore mal connues ou inconnues concernant les gamètes, la méiose, la mitose, la fécondation, la réceptivité utérine, etc ...Un dépistage prénatal peut être utile en cas de risque élevé d'aberration chromosomiques. Ainsi, le clinicien doit être en mesure de donner des explications des pertes de grossesses, et de proposer une prise en charge adéquate, en augmentant leur chances de réussir leurs futures grossesses.

3 CONSEIL GENETIQUE

Tous les couples souffrant d'ASPR et dont l'exploration cytogénétique a révélé une anomalie chromosomique doivent bénéficier d'un conseil génétique. Ce dernier a comme principal rôle de :

- Expliquer aux couples la physiopathologie de cette maladie dont ils souffrent ;
- les sensibiliser à l'inefficacité de toute hormonothérapie ou thérapeutique médicamenteuse ;
- étudier la possibilité théorique d'une grossesse à terme et le risque potentiel d'aberration chromosomique néonatale ;
- leur expliquer les risques, les bénéfices et les limites du diagnostic prénatal (DPN), principalement liés aux aléas techniques et à l'interprétation des résultats ;
- aider le couple à adopter la bonne décision lorsqu'une anomalie est détectée.

Le conseil génétique est une pratique médicale assez spécifique qui peut prendre beaucoup de temps. Il doit être demandé et réalisé en préconceptionnel. Ce conseil génétique doit être très strictement adapté au couple atteint d'anomalie chromosomique. Le généticien évalue le risque qu'une aberration chromosomique parentale équilibrée se reproduise ou apparaisse sous une forme déséquilibrée et provoque une fausse couche ou la naissance d'un nouveau né atteint [Frikha et al., 2012]. A la fin de la consultation, la décision revient au couple de choisir l'attitude thérapeutique qu'il lui convient.

4 DIAGNOSTIC PRENATAL (DPN)

Le diagnostic prénatal se base sur la réalisation d'un caryotype à partir d'un prélèvement fœtal, fait en intra utérin et à un âge gestationnel plus ou moins tôt. Il est indiqué chez les couples porteurs d'aberration chromosomique, permettant ainsi le diagnostic de toute anomalie fœtale ou embryonnaire. A l'issue du DPN la prise en charge consiste en une interruption thérapeutique de grossesse (ITG) en cas d'anomalie létale, ou incurable lors de son diagnostic. A l'heure actuelle le DPN permet dans peu de cas un traitement en intra-utérin et une bonne gestion de la grossesse et de l'accouchement.

Le prélèvement nécessaire à l'étude cytogénétique est réalisé au niveau:

- des villosités choriales (choriocentèse) sous contrôle échographique, entre 9 et 12 SA ;
- du liquide amniotique (amniocentèse) ;
- du sang du cordon ombilical (cordocentèse).

Ces techniques de DPN apportent une contribution incontestable à la détection des anomalies chromosomiques, mais elles gardent un risque abortif non négligeable (3%) [Frikha et al., 2012].

5 DIAGNOSTIC PRE-IMPLANTATOIRE (DPI)

A la lumière des résultats de l'étude cytogénétique du produit d'avortement, il est clair que les avortements spontanés chez les couples présentant des aberrations chromosomiques sont dues à des anomalies de structuretransmet de manière déséquilibrée. Le traitement approprié pour prédire et prévenir les anomalies chromosomiques est le diagnostic génétique préimplantatoire (DPI).

Au cours de la dernière décennie, le diagnostic génétique préimplantatoire (DPI) est devenu un nouvel outil d'investigation génétique des embryons avant l'implantation. C'est une méthode qui permet aux couples présentant un risque élevé de donner naissance à un nouveau né atteint d'une maladie génétique, la possibilité d'avoir des enfants en bonne santé. Contrairement aux méthodes traditionnelles de diagnostic prénatal, les couples suivant un DPI ont un risque moindre de faire face à la décision difficile d'interruption de grossesse. Le DPI a été rendu possible par le développement de plusieurs techniques : les techniques de fécondation in vitro (FIV) et de micromanipulation comme l'injection intracytoplasmique des spermatozoïdes (ICSI) et la biopsie du blastomère ou du corps polaire qui sont des pré-requis pour le DPI, tout comme les techniques de biologie moléculaire comme la réaction en chaîne par polymérase (PCR) et/ou l'hybridation fluorescente in situ (FISH).

À l'heure actuelle, la majorité des blastomères étudiés à partir du J3 de l'embryon est pour ladétermination du genre dans les troubles liés au sexe. Par ailleurs, plus de 300 maladies liées à l'X sont connues à ce jour, ces maladies sont toutes rares dans la population humaine, mais pour les couples ayant un gène défectueux, le risque d'avoir un enfant atteint est de 25% [Hanson et al., 2001].

25% à 30% des grossesses réussissent après transfert dans un contexte de DPI [Hanson et al., 2001]. En revanche, les aneuploïdies sporadiques représentent les anomalies cytogénétiques les plus fréquentes dans les produits d'avortement, mais elles ne sont pas transmises par les parents [Carp et al., 2004]. Ainsi, le DPI n'améliore pas la natalité, car les couples ayant une anomalie chromosomique perdent fréquemment des embryons euploïdes, mais il conserve son avantage dans les aneuploïdies récurrentes [Ogilvie et al., 2001]. La plupart des couples ont une forte chance de succès pour les grossesses ultérieures, malgré leurs antécédents de grossesses chromosomiquement anormales.

La cytogénétique n'est pas seulement un ensemble de techniques utiles à la pratique médicale, mais une partie de la génétique humaine qui facilite diverses études. La combinaison de différentes techniques de cytogénétique offre aujourd'hui un très large éventail d'options, ouvrant largement la voie à de nombreux développements, dont l'étude du développement humain et de la variation génomique.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le présent travail est le premier au Maroc et parmi les rares travaux via le monde entier, qui s'est intéressé à l'étude des dommages chromosomiques des couples souffrant d'avortements spontanés précoces à répétition. Il contribuerait à expliquer un certain nombre d'avortements qui restent de cause inconnues ou bien qui seraient faussement liés à d'autres facteurs. De cette étude, il a été conclu les résultats suivants:

- ✎ L'analyse chromosomique est une étude étiologique importante des couples souffrant de fausses couches à répétition (FCR), car elle aide au conseil génétique et à la décision du choix thérapeutique;
- ✎ La haute fréquence des micronoyaux, et l'augmentation du taux des aberrations chromosomiques et des échanges entre les chromatides sœurs dans les lymphocytes du sang périphérique en culture suggèrent que les couples atteints d'ASPR ont une forte incidence d'instabilité génomique.

Ainsi, ces tests pourraient constituer des biomarqueurs prédictifs d'accidents abortifs et de leurs répétitions; constituant ainsi des facteurs pronostiques, pour les futures grossesses. Il existe des preuves convaincantes que l'établissement d'une réponse inflammatoire chronique, associée à la présence d'un environnement oxydant local, pourraient jouer un rôle important dans l'étiologie et la progression de plusieurs complications de la grossesse. Le mode de vie moderne, la sédentarité, l'exposition aux toxines et les polymorphismes génétiques, prédisposent les individus à l'augmentation de l'inflammation et au stress oxydatif, en fin de compte conduit à une augmentation des dommages de l'ADN. Ceci peut avoir un impact sur les gamètes et/ou l'embryon en développement conduisant à l'infertilité, à des avortements et ou à des malformations congénitales.

À ce jour, la plupart des études se sont concentrées soit sur la relation entre les dommages de l'ADN maternel et fœtal ou bien la relation entre les dommages de l'ADN du sperme et l'infertilité. Les études futures doivent inclure à la fois les deux partenaires (la mère et le père), et le fœtus par rapport à l'issue de la grossesse. Ceci permettrait à la fois de fournir des seuils de dommages de l'ADN, et la prédiction par la suite des complications de la grossesse avec l'élaboration d'éventuelles interventions et stratégies de prévention.

Il est bien connu qu'une nutrition optimale, un indice de masse corporelle (IMC) correct, un sevrage tabagique, une restriction d'alcool, de caféine et une activité sportive régulière, en plus d'autres modifications du mode de vie pourraient réduire les dommages de l'ADN. Cette réduction fournirait aux couples une plus grande chance d'une conception naturelle avec un bon résultat obstétrical.

Propositions et Perspectives d'amélioration de la PEC des couples souffrant d'ASPR

L'amélioration de l'issue des grossesses est considérée comme un domaine important d'action pour ceux qui s'intéressent à l'amélioration de la santé reproductive des couples en général et à la santé des femmes

et des nouveau-nés en particulier. L'objectif principal est d'avoir des grossesses arrivant à terme et aboutissant à des naissances vivantes et saines. Ceci constitue un puissant indicateur de la santé de la femme et un bon reflet du développement du pays.

Au Maroc de nombreux programmes de santé se sont préoccupés de la promotion de la santé des femmes et des nouveau-nés, ayant comme finalité la diminution du taux de mortalité maternelle et de mortalité-naissance. Cependant, aucun ne s'est intéressé au problème que posent les avortements en général et les avortements à répétition en particulier (les causes, les facteurs de risque associés et l'élaboration d'une prise en charge thérapeutique codifiée). Bien que ce secteur de la santé soit considéré comme une priorité de la plupart des pays, il reste beaucoup de travail à faire dans notre contexte, et ce malgré les progrès cumulés au fil des années. Notre système de soins doit donner plus d'attention à la santé reproductive des couples ; les avortements ne sont pas inclus dans l'un des rapports annuels et les études dans ce domaine sont manquantes.

A la lumière de cette étude et à travers une large revue de la littérature, les ASPR nécessitent un bilan étiologique afin de déterminer les causes et permettre aux couples de bénéficier d'un traitement préventif ou curatif susceptible de réduire le risque de récurrence. De nombreuses études soulignent l'impact des facteurs environnementaux et de la nutrition sur la stabilité chromosomique, affectant la gamétogenèse, le développement embryonnaire et l'évolution de la grossesse. Ainsi, le bilan étiologique des avortements spontanés, et en particulier des ASPR, doit tenir compte de ces facteurs qui semblent représenter une voie prometteuse dans l'amélioration de la prise en charge des pathologies liées à la reproduction entre autres les avortements et qui reste encore mal explorée. Est-ce d'autant plus que ce sont des facteurs modulables sur lesquels on peut agir pour améliorer le pronostic de la grossesse.

La réalisation de larges études prospectives, incluant le mode de vie, les antécédents pathologiques, et le prélèvement d'échantillons biologiques avant et au cours de la grossesse, permettrait certainement une bonne compréhension du sujet et une meilleure prise en charge de ces couples. Ces études doivent être conçues avec des techniques d'évaluation des dommages d'ADN uniformes, afin que les résultats puissent être regroupés et facilement comparés.

A la fin nous proposons :

- De mettre en place un registre dédié aux avortements spontanés et comprenant toutes les données qui leur sont relatives (base de données) ;
- Améliorer l'offre de soins des couples souffrant de d'ASPR ;
- Sensibiliser les couples à consulter tôt, après le deuxième accident abortif ;
- Adopter un protocole de PEC bien codifié par les sociétés savantes sans omettre le soutien psychologique ;

- Le monitoring des dommages de l'ADN à l'aide des tests de génotoxicité (AC, MN, ECS) en préconceptionnel, pourrait constituer un bon facteur prédictif et pronostic des complications liées à la grossesse (pertes fœtales);
- Expliquer aux couples l'intérêt d'adopter un mode de vie sain et d'éviter, voir minimiser l'exposition aux facteurs environnementaux nuisibles pour la santé en générale et la santé reproductive en particulier ;
- Enfin insister sur l'importance du conseil génétique et sur la bonne collaboration entre le gynéco-obstétricien et le généticien.
- Et enfin, encourager et approfondir la recherche médicale dans ce domaine ;

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarli A, Kristoffersen EK, Jensen TS, Ulvestad E, Matre R. 1997. Suppressive effect on lymphoproliferation in vitro by soluble annexin II released from isolated placental membranes. *Am J Reprod Immunol* 38:313-319.
- Abdulrazzaq YM, Bener A, al-Gazali LI et al. 1997. A study of possible deleterious effects of consanguinity. *Clinical Genetics* 51, 167–173.
- Adachi Y, Kas E, Laemmli UK. 1989. Preferential cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold associated regions. *Embo J* 13:3997.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma R. 2005. Oxidative stress and its implications in female infertility—a clinician's perspective. *Reprod. Biomed. Online* 11 (November (5)), 641–650.
- Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S. 2006. What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology* 67:2–8.
- Agarwal A, Said T, Bedaiwy M, Banerjee J, Alvarez J. 2006. Oxidative Stress in an Assisted Reproductive Techniques Setting. *Fertil. Steril* 86, 503–512.
- Agarwal A, Saleh R, Bedaiwy M. 2003. Role of Reactive Oxygen Species in the Pathophysiology of Human Reproduction. *Fertil. Steril* 79, 829–843.
- Ahmad SA, Sayed MH, Barua S, Khan MH, Faruquee MH, Jalil A, Hadi SA, Taluk-der HK. 2001. Arsenic in drinking water and pregnancy outcomes. *Environ Health Perspect* 109: 629-631.
- AIHW National Perinatal Statistics Unit, 2004. Australian Babies: Their Health and Wellbeing, no. 21. AIHW National Perinatal Statistics Unit, Sydney.
- Aitken RJ, De Luliis, GN. 2007. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod. Biomed. Online* 14 (June (6)), 727–733.
- Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE. 2004. Seeds of concern. *Nature* 432 (November (7013)), 48–52.
- Akyil D, Konuk M. 2015. "Detection of genotoxicity and mutagenicity of chlorthiophos using micronucleus, chromosome aberration, sister chromatid exchange, and Ames tests," *Environmental toxicology*, vol. 30, pp. 937-945.
- Al-Abdulkareem AA, Ballal SG. 1998. Consanguineous marriage in an urban area of Saudi Arabia: rates and adverse health effects on the offspring. *Journal of Community Health* 23, 75–83.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR et al. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat. Res.*, 463, 111–172.
- Al-Hassan S, Hellani A, Al-Shahrani A, Al-Deery M, Jaroudi K, Coskun S. 2005. Sperm chromosomal abnormalities in patients with unexplained recurrent abortions. *Arch Androl* 51:69-76.
- Al-Saleh I, El-Doush, ArifJ, CoskunS, JaroudiK, Al-Shahrani A, El-DinMohamedG. 2010. Levels of DNA

- adducts in the blood and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization treatment and its correlation with the pregnancy outcome. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 84 (January (1)), 23–28.
- Al-Zubairi AS, Bustamam-Abdul A, Syam MM. 2010. Evaluation of the genotoxicity of zerumbone in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology in Vitro* 24: 707–712.
- Amahdar L. Caractérisation physicochimique et étude génotoxique du lixiviat de la décharge de la ville de Settat et des eaux souterraines ; thèse de doctorat soutenue Le 14 Mai 2011 ; Université Hassan I ; Faculté des Sciences et Techniques.
- Amory JK, Bremner W. 2001. Endocrine regulation of testicular function in men: implications for contraceptive development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 182: 175–179.
- Anderson K, Norman RJ, Middleton P, 2010. Preconception lifestyle advice for people with subfertility. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4, CD008189.
- Andersen AN, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. 2000. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *British Medical Journal*, volume 320, 1708-1712.
- Arab K, Pedersen M, Nair J, Meerang M, Knudsen LE, Bartsch H. 2009. Typical signature of DNA damage in white blood cells: a pilot study on etheno adducts in Danish mother-newborn child pairs. *Carcinogenesis*, 30, 282–285.
- Ariel I, Lustin O, Oyer CE, Gonik B, Rachmilewitz J, Biran H, Goshen R, de Groot N, Hochberg A. 1994. Relaxation of imprinting in trophoblastic disease. *Gynecol. Oncol.* 53, 212–219.
- Arredondo F, Noble LS. 2006. Endocrinology of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 24:33-39.
- Athey J, Spielvogel AM. Risk factors and interventions for psychological sequelae in women after miscarriage. 2000. *Prim Care Update Ob Gyns* 7:64-9.
- Augusto LGD, Lieber SR, Ruiz MA, Desouza CA. 1997. Micronucleus monitoring to assess human occupational exposure to organochlorides. *Environ Mol Mutagen* 29:46 -52.
- Axelsson G, Rylander R. 1989. Exposure to anaesthetic gases and spontaneous abortion: response bias in a postal questionnaire study. *Int J Epidemiol* 11: 250-256.
- Azim M, Khan AH, Khilji ZL, Pal JA, Khurshid M. 2003. Chromosomal abnormalities as a cause of recurrent abortions: a hospital experience. *J Pak Med Assoc* 53(3):117–9.
- Azofeifa J, Voit T, Hubner C, Cremer M. 1995. X-chromosome methylation in manifesting and healthy carriers of dystrophinopathies: concordance of activation ratios among first degree female relatives and skewed inactivation as cause of the affected phenotypes. *Hum Gen et.* 96:167-176.
- Babazadeh Z, Razavi S, Tavalae M, Deemeh MR, Shahidi M, Nasr-Esfahani MH. 2010. Sperm DNA damage and its relation with leukocyte DNA damage. *Reprod. Toxicol.* 29 (January (1)), 120–124.
- Bacqué M-F. 1995. *Le deuil à vivre*. Paris: Odile Jacob.
- Baek KH. 2004. Aberrant gene expression associated with recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod.*

10:291-297.

- Baek KH, Choi BC, Lee J-H, Choi H-K, Lee S-H, Kim J-W, Hill JA, Chung H-M, Ko JJ, Cha KY. 2002. Comparison of gene expression at the feto-maternal interface between normal and recurrent pregnancy loss patients. *Reprod Fertil Dev.* 14:235–240.
- Bagchi D, Friedman T. 1999. Psychological aspects of spontaneous and recurrent abortion. Volume 9, Issue 1, March, Pages 19-22.
- Bainbridge SA, Belkacemi L, Dickinson M, Graham CH, Smith GN., 2006. Carbon monoxide inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and secondary necrosis in syncytiotrophoblast. *Am. J. Pathol.* 169 (September (3)), 774–783.
- Bajekal N, Li TC. 2000. Fibroids, infertility and pregnancy wastage. *Hum Reprod Update.* 6:614-620.
- Baker P, Monga AK. 2006. *Gynaecology.* 18th ed. Pub: Arnold, London, 63-71.
- Baker TG. 1963. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 158: 417–433.
- Balasz J. 2010. Ageing and infertility: an overview. *Gynecol Endocrinol* 26: 855–60.
- Balogh A, Liewald T, Liewald S, Schröder S, Klinger G, Splinter FC, Hoffmann A. 1990. Effect of a new gestagen-dienogest--and its combination with ethinyl estradiol on the activity of biotransformation reactions. *Zentralbl Gynakol.* 112(12):735-46.
- Baltaci V, Aygun N, Akyol D, Karakaya AE, Sardas S. 1998. Chromosomal aberrations and alkaline comet assay in families with habitual abortion. *Mutation Research.* sep 1; 417(1): 1998 47–55.
- Barale R, Chelott L, Davini T, Del Ry S, Andreassi MG, Ballardini M. 1998. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population, Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ. Mol. Mutagen.*, 31: 228–242.
- Barratt CL, Aitken RJ, Bjorndahl L, Carrell DT, de Boe P, Kvist U, Lewis SE, Perreault SD, Perry MJ, Ramos L, Robaire B, Ward S, Zini A. 2010. SpermDNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications—a position report. *Hum. Reprod.* 25 (April (4)), 824–838.
- Barroso G, Morshed M, Oehninger S. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 15 (June (6)), 1338–1344.
- Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendano C, Oehninger S. 2009. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil. Steril.* 92 (September (3)), 835–848.
- Bartsch H, Nair J. 2006. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch. Surg.* 391 (September (5)), 499–510.
- Barzilai, A., Yamamoto, K., 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst.)* 3 (August September (8–9)), 1109–1115.
- Beaconsfield P, Ginsberg J. 1968. *Lancet* 1: 592.

- Bedford JM. Effect of duct ligation on the fertilizing capacity of spermatozoa in the epididymis. *J Exp Zool.* 1967;166:271–81.
- Bellve AR, Zheng W. 1989. Growth factors as autocrine and paracrinomodulators of male gonadal functions. *J Reprod Fertil* 85:771–793.
- Belmont JW. 1996. Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing. *Am J Hum Genet.* 58:1101–1108.
- Benammar A, Sermondade N, Faure C, Dupont C, Cedrin-Durnerin I, Sifer C, et al. Nutrition and miscarriages: a literature review. *Gynecol Obstet Fertil* 2012;40:162-9.
- Bener A, Alali KA. 2006. Consanguineous marriage in a newly developed country: the Qatari population. *J Biosoc Sci.* 38:239–46.
- Benirschke K and Kaufmann P. 1995. *Pathology of the Human Placenta.* 3rd ed. Springer-Verlag, New York.
- Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS, Hershlag A, Scholl GM, Rosenfeld DL. 1993. Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Hum Reprod* 8:2155–66.
- Benzacken B, Carbillon L, Dupont C, Siffroi JP, Monier-Gavelle F, Bucourt M, Uzan M, Wolf JP. 2002. Lack of submicroscopic rearrangements involving telomeres in reproductive failures. *Hum Reprod.* May;17(5):1154-7.
- Berkowitz RS, Bernstein MR, Harlow BL et al., 1995. Case-control study of risk factors for partial molar pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; 173: 788-794.
- Bernhard F, Lukas S, Karl-Heinz W. 2020. Chromosomal damage measured by the cytokinesis block micronucleus cytome assay in diabetes and obesity - A systematic review and meta-analysis. *Mutation Research.* 786: 108343.
- Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A, Golan A. 2000. Morbidity and mortality among very-low birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182 (January (1 Pt 1)), 198–206.
- Berry CW, Bramabati B, Eskes TKAB, Exalto N, Fox H, Geraedts JPM, Geraedts I, Gonazales Gomes F, Grudzinkas JG, Hustin J, Jouppila P, Lindblom B.K.A, Manton M, Montenegro N, Nogales Fernandes F, O'Rahilly R, J.F. Pedersen JF, Peters PWJ, Regan L, Rushton DI, van Straaten HWM, Tarlatzis BC, Wells M. 1995. The Euro-Team Early Pregnancy (ETEP) protocol for recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 10:1516–20.
- Betts DR, Fear CN, Barry T, and Seller MJ, 1989. A 45,X/69,XXY fetus. *Clin. Genet*; 35, 285–288. Blackburn WR, Miller WP, Superneau DW, Cooley NR, Zellweger H, and Wertelecki W. 1982. Comparative studies of infants with mosaic and complete triploidy: An analysis of 55 cases. *Birth Defects: Original Article Series*; 18, 251–274.
- Bobadilla-Morales L, Cervantes-Luna MI, Garcia-Cobian TA, Gomez-Meda BC, de la Torre CO, Corona Rivera JR, Corona-Rivera A. 2009. Chromosome instability in a patient with recurrent abortions. *Genet. Couns.* 20 (2), 153–159.

- Bocskay, K.A., Tang, D., Orjuela, M.A., Liu, X., Warburton, D.P., Perera, F.P., 2005. Chromosomal aberrations in cord blood are associated with prenatal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14 (February (2)), 506–511.
- Bolognesi C, Abbondandolo A, Baale R, Casalone R, Dalpra L, DeFerrari M. (1997). Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6: 249–256.
- Bolumar F, Olsen J, Rebagliato M, Bisanti L, and the European study Group on Infertility and Subfecundity. 1997. Caffeine intake and delayed conception: a European multicenter study on infertility and subfecundity. *American Journal of Epidemiology*, 145(4), 324-334.
- Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Jia C, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fucic A, Lima OG, Hrelia P, Krishnaja AP, T K Lee, Migliore L, Mikhalevich L, Mirkova E, Mosesso P, Müller WU, Odagiri Y, Scarffi MR, Szabova E, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A. 2001. Human MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31–45.
- Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Stromberg U, Vermeulen R, Tucker J D. 2005. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 258–270.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M. 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28, 625–631.
- Bose P, Black S, Kadyrov M, Weissenborn U, Neulen J, Regan L, Huppertz B (2005). Heparin and aspirin attenuate placental apoptosis in vitro: implications for early pregnancy failure. *Am J Obstet Gynecol.* 192:23-30.
- Botta A, Occhipinti P, Bartfai E, Orsiere T. 1996. Genotoxic effects of potassium dichromate in cultural human lymphocyte. *Med Sci Res.* 24:797–9.
- Botto N, Andreassi MG, Manfredi S, Masetti S, Cocci F, Colombo MG, Storti S, Rizza A, Biagini A. 2003. Genetic Polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. *Eur. J. Hum. Genet.*, 11, 671–678.
- Botto N, Rizza A, Colombo MG, Mazzone AM, Manfredi S, Masetti S, Clerico A, Biagini A, Andreassi MG. 2001. Evidence for DNA damage in patients with coronary artery disease. *Mutat. Res.*, 493, 23–30.
- Boué A, Boué J, Gropp A. 1985. Cytogenetics in pregnancy wastage. *Adv. Hum. Genet.*, 14: 1-57.
- Boué J, Boué A, and Lazar P. 1975. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* 12, 11–26.

- Boué J, Philippe E, Giroud A and Boué A. 1976. Phenotypic expression of lethal chromosomal anomalies inhuman abortuses. *Teratology*; 14, 3–20.
- Bourrouillou G, Colombies P, Dastugue N. 1986. Chromosome studies in 2136 couples with spontaneous abortions. *Hum Genet*.Dec;74(4):399-401.
- Boyles SH, Ness RB, Grisso JA, Markovic N, Bromberger J, CiFelli D. 2000. Life event stress and the association withspontaneous abortion in gravid women at an urban emergency department. *Health Psychol*. 19: 510-514.
- Brackeeleer MD, Dao TN. 1990. Cytogenetic Studies in Couples Experienc-ing Repeated Pregnancy Losses. *Human Reproduction*, 5, 518-528.
- Brandt LP, Nielsen CV. 1992. Job stress and adverse outcome of pregnancy: a causal link or recall bias? *Am J Epidemiol*. 35: 302-311.
- Bray I, Gunnell D, Davey Smith G. 2006. Advanced paternal age: how old is too old? *J Epidemiol Community Health*. 60: 851–3.
- Brigham SA, Conlon C, Farquharson RG. 1999. A longitudinal study of pregnancy outcome following idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod*14:2868–71.
- Brody S, Frank U. 1993. *Obstetrik och gynekologi: klinisk praxis och teoretisk bakgrund*, ed 9., omarb. uppl. Stockholm: Almqvist & Wiksell.
- Bromley B, Harlow BL, Laboda LA, BenacerrafBR. 199. Small sac size in the first trimester: a predictor of poor fetaloutcome.*Radiology*, 178,375.
- Brown CJ, Robinson WP. 2000. The causes and consequences of random and non-random X chromosome inactivation in humans. *Clin Genet*. 58:353-363.
- Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E. 1996. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update*. 2:118-136.
- Burcham PC. 1999. Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutat. Res*. 443 (July (1–2)),11–36.
- Buss L, Tolstrup J, Munk C, Bergholt T, Ottesen B, Grønbaek M, Kjaer Sk. 2006. Spontaneous abortion: a prospective cohort study of younger women from the general population in Denmark. Validation, occurrence and risk determinants. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 85:467e75.
- Bussen S, Sutterlin M, Steck T. 1999. Endocrine abnormalities during follicular phase in women with recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod*. 14:18-20.
- Bydlowski M. *La dette de vie itinéraire psychanalytique de la maternité*. Paris: PUF; 2002.
- Byskov AG. 1986. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol. Rev*. 66: 71– 117.
- Calogero A, Polosa R, Perdichizzi A, Guarino F, La Vignera S, Scarfia A, Fratantonio E, Condorelli R, Bonanno

- O, Barone N, Burrello N, Rosario D'Agata R, Enzo Vicari E. 2009. Cigarette smoke extract immobilizes human spermatozoa and induces sperm apoptosis. *Reprod Biomed Online*, 19:564–571.
- Campana M, Sera A, Neri G. 1986. Role of chromosome aberrations in recurrent abortion: a study of 269 balanced translocations. *Am J Med Genet*. Jun;24(2):341-56.
- Carassou P, Meijer L, Moulec S, Aoun J, Bengrine-Lefèvre L. Le cycle cellulaire et ses cibles: inhibition des CDK," *Bulletin du Cancer*, vol. 99, pp. 163-171, 2012.
- Carp H, et al. Parental karyotype and subsequent live births in recurrent miscarriage. 2004. *Fertil Steril*. 81(5):1296—301.
- Carr D H.: *Lancet* 2: 830, 1967.
- Carrington B, Sacks G, Regan L. 2005. Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 17:591-597.
- Casanueva E, Viteri FE. 2003. Iron and oxidative stress in pregnancy. *J.Nutr*. 133 (May (5 Suppl. 2)), 1700S-1708S.
- Cashner KA, Christopher CR, Dysert GA. 1987. Spontaneous fetal loss after demonstration of alive fetus in the first trimester. *Obstet.Gynecol*, 70,827-83.
- Casson IF, Clarke CA, Howard CV, McKendrick O, Pennycook S, Pharoah PO, Platt MJ, Stanisstreet M, van Velszen D, Walkinshaw S. 1997. Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. *BMJ*. Aug; 315(7103):275-8.
- Castilla JA, Zamora S, Gonzalvo MC, Luna del Castillo JD, Roldan-Nofuentes JA, Clavero A, Björndahl L, Martínez L. 2020. Sperm Chromatin Structure Assay and Classical Semen Parameters: Systematic Review. *Reprod. BioMed. Online* 20, 114–124.
- Celep F, Karagüzel A, Ozeren M, Hasan Bozkaya H. 2006. The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 127(1):106—9.
- Chambers JC, Fusi L, Malik IS, Haskard DO, De Swiet M, Kooner JS. 2001. Association of maternal endothelial dysfunction with preeclampsia. *JAMA* 285 (March (12)), 1607–1612.
- Chandley AC, Edmond P, Christie S, Gowans L, Fletcher J, Frackiewicz A, Newton M. 1975. Cytogenetics and Infertility in Man. I: Karyotype and Seminal Analysis: Results of a Five-Year Survey of Men Attending a Subfertility Clinic. *Annals of Human Genetics*, 39, 231-254.
- Chard T. Pregnancy tests: a review. *Hum Reprod* 1992; 7: 701-710.
- Chavatte-Palmer P, Guillomot M. 2007. Comparative implantation and placentation. *Gynecol Obstet Invest*. 64:166-174.
- Chen L, Guo H, Yuan J, He M, Chen D, Shi J, Yang J, Bai Y, Ju Y, Liu A, Yu Z, Li L, Sheng G, Fu J, Wu T, Chen X. 2010. Polymorphisms of GSTT1 and GSTM1 and increased micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes in residents at an e-waste dismantling site in China. *J. Environ. Sci. Health A: Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng*. 45 (March (4)), 490–497.

- Choi H-K, Choi BC, Lee S-H, Kim J-W, Cha KY, Baek K-H. 2003. Expression of angiogenesis and apoptosis related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy patients. *Mol Reprod. Dev* 66:24–31.
- Ciccone R, Giorda R, Gregato G, Guenini R, Giglio S, Cmozzo R, Bonaglia MC, Priolo E, Laganh C, Tenconi R, Rocchi M, Pramparo T, Zuffardi O, Rossi E. 2005. Reciprocal translocations: a trap for cytogenetists? *Hum Genet.* Oct;117(6):571-82.
- Cindrova-Davies, T. 2009. Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. *Placenta*, 30(Suppl A), S55–S65.
- Clermont Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52: 198–236.
- Clifford K, Rai R, Watson H, Regan L. 1994. An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases. *Hum Reprod.* 9:1328-1332.
- Cnattingius D, Signorello LB, Anneren G, Clausson B, Ekblom A, Ljunger E, Blot WJ, McLaughlin JK, Petersson G, Rane A, Granath F. 2000. Caffeine intake and the risk of first-trimester spontaneous abortion. *N Eng J Med.* 343:1839-1845.
- Coan PM, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. 2005. Imprinted genes in the placenta a review. *Placenta.* 26 Suppl A:S10-20.
- Cogswell ME, Weisberg P, Spong C. 2003. Cigarette smoking, alcohol use and adverse pregnancy outcomes: implications for micronutrient supplementation. *J. Nutr.* 133 (May (5 Suppl. 2)), 1722S–1731S.
- Cohen O, Cans C, Cuillel M, Gilardi JL, Roth H, Mermet MA, Jalbert P, Demongeot J. 1996. Cartographic study: breakpoints in 1574 families carrying human reciprocal translocations. *Hum Genet.* May;97(5):659-67.
- Cole LA, Khanlian SA, Sutton JM, Davies S, Rayburn WF. 2004. Accuracy of home pregnancy tests at the time of missed menses. *Am J Obstet Gynecol.* 190: 100-105.
- Conde-Agudelo A, Belizán JM, Breman R, Brockman SC, Rosas-Bermudez A. 2005. Effect of the interpregnancy interval after an abortion on maternal and perinatal health in Latin America. *Int J Gynaecol Obstet*;89(Suppl 1):S34–40.
- Conde-Ferraz L, Chan May Ade A, Carrillo-Martinez JR, Ayora-Talavera G, Gonzalez-Losa M del R. Human papillomavirus infection and spontaneous abortion: a case-control study performed in Mexico. 2013. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 170:468–73.
- Conti M, Chang RJ. 2016. Chapter 125 - Folliculogenesis, Ovulation, and Luteogenesis. In: Jameson JL, De Groot LJ, de Kretser DM, Giudice LC, Grossman AB, Melmed S, Potts JT, Weir GC, editors. *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders, p 2179-2191.e3.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J, 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17 (July (10)), 1195–1214.
- Coulam CB, Goodman C, Dorfmann A. Comparison of ultrasonographic findings in spontaneous abortions

- with normal and abnormal karyotypes. *Human Reproduction* vol. 12 no.4 pp.823–826, 1997.
- Couto E, Barini R, Zaccaria R, Annicchino-Bizzacchi JM, Passini Junior R, Pereira BG, Silva JC, Pinto e Silva JL. 2005. Association of anticardiolipin antibody and C677T in methylenetetrahydrofolate reductase mutation in women with recurrent spontaneous abortions: a new path to thrombophilia? *Sao Paulo Med J.* 123:15-20.
- Costeas PA, Koumouli A, Giantsiou-Kyriakou A, Papaloizou A, Koumas L (2004). Th2/Th3cytokine genotypes are associated with pregnancy loss. *Hum Immunol.* 65:135-141.
- Cotzias CS, Paterson-Brown S, Fisk NM. Prospective risk of unexplained stillbirth in singleton pregnancies at term: population based analysis. *BMJ* 1999;319:287–8.
- Coulam, C.B. (1991). Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 26: 23-27.
- Coulam CB, Jeyendran RS. 2008. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 59:301-305.
- Cowchock FS, Gibas Z, and Jackson LG. 1993. Chromosomal errors as a cause of spontaneous abortion: the relative importance of maternal age and obstetrical history. *Fertil. Steril.*; 59: 1011–1014.
- Cramer DW, Wise LA. 2000. The epidemiology of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 18: 331-339.
- Creasy MR, Crolla JA, and Alberman ED. 1976. A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques. *Hum. Gene.* 31, 177–196.
- Cross JC. 2006). Placental function in development and disease. *Reprod Fertil Dev.* 18:71-76.
- Cross JC, Werb Z and Fisher SJ. 1994. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science.* 266:1508-1518.
- Daher S, Shulzhenko N, Morgun A, Mattar R, Rampim GF, Camano L, DeLima MG. 2003. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol.* 58:69-77.
- Dakouane M, Albert M, Bergère M, Sabbagh C, Brayotel F, Vialard F, Lombroso R, Bicchieray L, Selva J. 2005. Aging and spermatogenesis: an histologic, cytogenetic and apoptosis study. *Gynecol Obstet Fertil.* 33(9):659—64.
- Dalton CF, Laird SM, Estdale SE, Saravelos HG, Li TC. 1998. Endometrial protein PP14 and CA-125 in recurrent miscarriage patients; correlation with pregnancy outcome. *Hum Reprod.*13:3197–3202.
- Damjanovic A K, Yang Y, Glaser R, Kiecolt-Glaser J K, Nguyen H, Laskowski B, Zou Y, Beversdorf D Q, Weng NP.2007. Accelerated telomere erosion is associated with a declining immune function of caregivers of Alzheimer’s disease patients. *J. Immunol.*, 179, 4249–4254.
- DaVanzo J, Hale L, Razzaque A, Rahman M. 2007.Effects of interpregnancy interval and outcome of the preceding pregnancy on pregnancy outcomes in Matlab, Bangladesh.*BJOG.* 114:1079–1087.

- Davison EV and Burn J. 1990. Genetic causes of early pregnancy loss. In *Early Pregnancy Failure* Huisjes, HJ and Lind, T, eds., Churchill Livingstone, New York, pp. 55–78.
- Dawson, D.W. and Bury, H.P. 1961. The significance of Howell–Jolly bodies and giant meta myelocytes in marrow smears. *J. Clin. Pathol.*, 14: 374–380.
- Dearfield KL, Cimino MC, McCarroll NE, Mauer I, Valcovic LR. 2020. US Environmental Protection Agency. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutat Res.* 521:121–35.
- Dearfield KL, Moore MM. 2005. Use of genetic toxicology information for risk assessment. *Environ Mol Mutagen.* 46:236–45.
- De Bont R, van Larebeke N. 2004. Endogenous DNA damage in humans:a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19 (May (3)), 169–185.
- De Braekeleer M, Dao TN. 1990. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod.* Ju1;5(5):519-28.
- Decordier I, Kirsch M.2006. The in vitro micronucleus test: From past to future. *Mutat. Res.*, 607: 2–4.
- Delaroché I, Sabani M, Calabrese G, Mingarelli R, Palka G, Dallapiccola B. 1995. Fetal translocation between chromosomes 2, 18, and 21 resolved by fish. *Prenat Diagn.* Mar; 15(3):278-81.
- De la Rochebrochard E, de Mouzon J, Thepot T, Thonneau F. Fathers over 40 and increased failure to conceive: the lessons of in vitro fertilization in France. 2006. *Fertil Steril.* 80: 1420–4.
- Demirel S, Kaplanoglu N, Acar A, S Bodur, F Paydak. 1997. The frequency of consanguinity in Konya, Turkey, and its medical effects. *Genetic Counselling.* 8, 295–301.
- Desai N, Ludgin J, Sharma R, Anirudh RK, Agarwal A. 2017. Female and Male Gametogenesis. In: Falcone T, Hurd WW, editors. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide.* Cham: Springer International Publishing, p 19–45.
- Devine DH, Whitman-Elia G, Best RG, Edwards JG. 2000. Paternal paracentric inversion of chromosome 2: a possible association with recurrent pregnancy loss and infertility. *J Assist Reprod Genet.* 17:293–296.
- Dewald G, Alvarez MN, Cloutier MD, Kelalis PP, and Gordon H. 1975. A diploid-triploid human mosaic with cytogenetic evidence of double fertilization. *Clin. Genet;* 8, 149–160.
- Dewan S, Puscheck EE, Coulam CB, Wilcox AJ, Jeyendran RS. 2006. Y chromosome microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 85:441-445.
- Dhillon V, Singh J, Singh H, Kler R. 1994. In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of hormonal drugs v. mestranol. *Mutat. Res.*, 322: 173–183.
- Dhont M. 2003. Recurrent miscarriage. *Curr Womens Health Rep.* 3:361-366.
- Diejomaoh M EF. 2015. Recurrent Spontaneous Miscarriage Is Still a Challenging Diagnostic and Therapeutic

- Quagmire. *Med Princ Pract.* 24(suppl 1):38–55.
- Dietl J. 2005. Maternal obesity and complications during pregnancy. *J. Perinat. Med.* 33 (2), 100–105.
- Dickey RP, Gasser RF, Olar TT, Curole DN, Taylor SN, Matulich EM, West JD, Tsien F. 1994. The relationship of initial embryo crown–rump length to pregnancy outcome and abortus karyotype based on new growth curves for the 2–21 mm embryo. *Hum. Reprod.*, 9, 366–373.
- Dimassi S, Tilla M, Sanlaville D. 2017. Anomalies chromosomiques. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, vol. 30, pp. 249-270, 2017.
- Dizon-Townson DS, Lu J, Morgan TK, Ward KJ. 2000. Genetic expression by fetal chorionic villi during the first trimester of human gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 183:706-711.
- Doll, R., Peto, R., 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66 (June (6)), 1191–1308.
- Dominguez-Rojas V, de Juanes-Pardo JR, Astasio-Arbiza P, Ortega-Molina P, Gordillo-Florencio E. 1994. Spontaneous abortion in a hospital population: are tobacco and coffee intake risk factors? *Eur J Epidemiol.* 10:665-668.
- Donders GG, Van Bulck B, Caudron J, Londers L, Vereecken A, Spitz B. 2000. Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol.* 183:431-7.
- Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbo CB, Kavli B, Bratlie MS, Pena-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE. 2004. Alkylation damage in DNA and RNA repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst.)* 3 (November (11)), 1389–1407.
- D'Souza D, Thomas IM, Das BC. 1988. Variation in spontaneous chromosomal damage as a function of biologic rhythms in women. *Hum Genet.* May; 79(1):83-5.
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. 2000. Human male Infertility: chromosomal anomalies. Meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update.* 6:93-105.
- Elghezal H, Hidar S, Mougou S, Khairi H, Saâd A. Prevalence of chromosomal abnormalities in couples with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2007;88(3):721–3.
- Empson M, Lassere M, Craig JC, Scott JR. 2002. Recurrent pregnancy loss with antiphospholipid antibody: a systematic review of therapeutic trials. *Obstet Gynecol.* 99(1):135-144.
- ESHRE Capri Workshop Group. 2008. Genetic aspects of female reproduction. *Hum. Reprod.* 14(4): 293-307.
- Eskenazi B. 1999. Caffeine filtering the facts. *The New England Journal of Medicine.* 341(22), 1688-689.
- Falaq N, Smita J, Nishat A, Mohammad A, Yasir H. 2012. Genotoxic damage in cultured human peripheral blood lymphocytes of oral contraceptive users. *The Egypt. J. Med. Hum. Gene.* 13: 301–305.

- Falcone T, Hurd WW eds. 2013. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide*, 2e. New York: Springer-Verlag.
- Farquharson RG, Quenby S, Greaves M (2002). Antiphospholipid syndrome in pregnancy: a randomized, controlled trial of treatment. *Obstet Gynecol.* 100(3):408-413.
- Fausser BC, Van Heusden AM. 1997. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr. Rev.* 18: 71–106.
- Federici C, Botto N, Manfredi S, Rizza A, Del Fiandra M, Andreassi M G. 2008. Relation of increased chromosomal damage to future adverse cardiac events in patients with known coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 102, 1296–1300.
- Fenech M, "Micronucleus frequency in human lymphocytes is related to plasma vitamin B12 and homocysteine," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 428, pp. 299-304, 1999.
- Fenech, M. (2001) Recommended dietary allowances (RDAs) for genomic stability. *Mutat. Res.*, 480-481, 51–54.
- Fenech M. 2005. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Res.* 147: 29-36.
- Fenech, M. (2007) Genome health nutrigenomics and nutrigenetics diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. *Food Chem. Toxicol*, 46, 1365–1370
- Fenech M, Baghurst P, Luderer W, Turner J, Record S, Ceppi M, Bonassi S. 2005. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis*, 26, 991–999.
- Fenech M, Bonassi S. 2011. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* vol. 26 n°. 1 pp. 43–49.
- Fenech M, Bonassi S, Turner J, Lando C, Ceppi M, Chang WP, et al., "Intra-and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes: Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project," *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 534, pp. 45-64, 2003.
- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan, AT, Surralles J, Crott JW, Parry J. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26: 125–132, 2011.
- Fenech M, Morley A.A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, 147: 29–36.
- Fenech M, Morley AA. 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat. Res.*, 161, 193–198.
- Fenech M, Neville S, Rinaldi J. 1994. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in

- cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutation Res.* 313:203–7.
- Fenster L, Eskenazi B, Windham GC, Swan SH. 1991. Caffeine consumption during pregnancy and spontaneous abortion. *Epidemiology.* 2: 168-174.
- Fenster L, Schaefer C, Mathur A, Hiatt RA, Pieper C, Hubbard AE, Von Behren J, Swan SH. 1995. Psychologic stress in the workplace and spontaneous abortion. *Am J Epi-demiol.* 142: 1176-1183.
- Ferlin, A, Arredi B, Foresta C. 2006. Genetic causes of male infertility. *Reprod. Toxicol.* 22 (August (2)), 133-141.
- Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresta C. 2007. Molecular and clinical characterization of y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:762-770.
- FitzSirnrons J, Wapner RJ, Jackson LG. 1983. Repeated pregnancy loss. *Am J Med Genet.* Sep;16(1):7-13.
- Fletcher RH, Fairfield KM. 2002. Vitamins for chronic disease prevention in adults: clinical applications. *JAMA,* 287, 3127–3129.
- Flis-Trèves M. *Le deuil de maternité.* Paris: Calmann-lévy; 2004.
- Florack EI, Zielhuis GA, Pellegrino JE, Rolland R. 1993. Occupational physical activity and the occurrence of spontaneous abortion. *Int J Epidemiol.* 22: 878-884.
- Ford JH, MacCormac L. 1995. Pregnancy and life style study: the long term use of the contraceptive pill and the risk of age related miscarriage. *Human Reproduction* vol.10 no.6 pp.1397-1402.
- Ford RP, Schluter PJ, Mitchell EA, Taylor BJ, Scragg R, Stewart. 1998. Heavy caffeine intake in pregnancy and sudden infant death syndrome: New Zealand Cot Death Study Group. *Archives of Disease in Childhood,* 78(1), 9-13.
- Foresta C, Garolla A, Bartoloni L, Bettella A, Ferlin A (2005). Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:152-156.
- Fortune JE. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 135–163.
- Franco B, Ballabio A. 2006. X-inactivation and human disease: X-linked dominant male-lethal disorders. *Curr Opin Genet Dev.* 16:254-259.
- Maureen T M Franssen, Johanna C Korevaar, Nico J Leschot, Patrick M M Bossuyt, Alida C Knegt, Klasien B J Gerssen-Schoorl, Cokkie H Wouters, Kerstin B M Hansson, Ron Hochstenbach, Kamlesh Madan, Fulco van der Veen, Mariette Goddijn. 2005. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ.* 331(7509):137—41.
- Franssen MT, Korevaar CJ, Van der Veen F, Leschot JN, Bossuyt MP, Goddijn M. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index [corrected]-control study. *BMJ.* 2006 Apr 1; 332 (7544):759-63.

- Frates MC, Benson CB, Doubilet PM. 1993. Pregnancy outcome after a first trimester sonogram demonstrating fetal cardiac activity. *J. Ultrasound. Med.*, 12, 383–386.
- French FE, Bierman JM, 1962. Probabilities of fetal mortality. *Public Health Re*; 77, 835–847.
- Frikha R, Bouayed NA, Rebai T. Prévalence des anomalies cytogénétiques parentales au cours de l'avortement spontané récurrent: à propos de 168 couples. 2012. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, vol. 27, pp. 223-232.
- Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, Schmidt S, Coerdts W, Müntefering H, Rehder H. 2001. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)– Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet*; 9: 539–47.
- Fryns JP, Van Buggenhout G. 1998. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 81:171-176.
- Fujimoto T, Miyayama Y, Fuyuta M. 1977. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat. Rec.* 188: 315–330.
- Funes-Cravioto F, Zapata-Gayon C, Colmodin-Hedman B, Lambert B, Lindsten J, Norberg E, Nordenskjöld M, Olin R, Swensson A. 1977. Chromosome aberrations and sister chromatid exchange in workers in chemical laboratories and a rotoprinting factory and in children of women laboratory workers, *Lancet*. ii:322-325.
- Furness DL, Dekke GA, Hague WM, Khong TY, Fenech MF. 2010. Increased lymphocyte micronucleus frequency in early pregnancy is associated prospectively with pre-eclampsia and/or intrauterine growth restriction. *Mutagenesis* 25 (September (5)), 489–498
- Furness DL, Fenech MF, Khong YT, Romero R, Dekker GA. 2008. One-carbon metabolism enzyme polymorphisms and uteroplacental insufficiency. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 199, e271–e278.
- Fuster C, Miguez L, Miró R, Rigola MA, Perez A, Egozcue J. 1997. Familial complex chromosome rearrangement ascertained by in situ hybridisation. *J Med Genet.* Feb;34(2): 164-6.
- Gadow EC, Lippold S, Otano L, Serafin E, Scarpati R, and Metayoshi T. 1991. Chromosome rearrangements among couples with pregnancy losses and other adverse reproductive outcomes. *Am. J. Med. Genet.* 41, 279–281.
- Gaillard DA, Paradis P, Lallemand AV, Vernet VM, Carquin JS, Chippaux CG, Visseaux-Coletto BJ. 1993. Spontaneous abortions during the second trimester of gestation. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117, 1022–1026.
- Ganrot PO, Laurell C-B, Nilsson-Ehle P. *Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin*, ed 8. Lund: Studentlitteratur, 2003.
- García-Enguידanos A, Martínez D, Calle ME, Luna S, De Bernabé JV, Domínguez-Rojas V. Long-term use of oral contraceptives increases the risk of miscarriage *Volume 83, ISSUE 6, P1864-1866, June 01, 2005.*
- Gardner RJM, Sutherland GR. 1996. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling*. 2nd Edition,

Oxford University Press, New York.

Gazali AI, Hamamy H, Arrayad, SA. 2006. Genetic disorders in the Arab world. *Br Med J*.333:831–34.

Georges Suh, Larsen, Letombe, (2014). *J Mol Endocrinol*.

Gerri C, Menchero S, Mahadevaiah SK, Turner JMA , Niakan kk. 2020. Human Embryogenesis: A comparative Perspective. *Annu Rev Cell Dev Biol* .Oct 6;36:411-440.

Ghosh R, Ghosh PK. 1988. Sister chromatid exchanges in the lymphocytes of control women, pregnant women and women taking oral contraceptives: effects of cell culture temperature. *Environ. Mol. Mutagen*, 12: 179–183.

Girardi G. 2005. Heparin treatment in pregnancy loss: Potential therapeutic benefits beyond anticoagulation. *J Reprod Immunol*. 66:45-51.

Godijn M, Joosten JH, Knecht AC, van derVeen F, Franssen MT, Bonse GJ, Leschot NJ. 2004. Clinical relevance of diagnosing structural chromosome abnormalities in couples with repeated miscarriage. *Hum Reprod*. Apr;19(4):1013-7. Epub 2004 Feb 27.

Godijn M, Leschot N. 2000. Genetic aspects of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* , 14:855– 865.

Goldstein SR.1992. Significance of cardiac activity on endovaginal ultrasound in very early embryos. *Obstet. Gynecol*.65,250–253.

Goldstein SR.1994. Embryonic death in early pregnancy: a new look at the first trimester. *Obstet.Gynaecol*. 84,294-297.

Gondos B, Westergaard L, Byskov AG. 1986. Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 155: 189–195.

Goto T, Adjaye J, Rodeck CH, Monk M. 1999. Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. *Mol. Hum. Reprod*. 5: 851–860.

Gouin JP, Hantsoo L, Kiecolt-Glaser JK. 2008. Immune dysregulation and chronic stress among older adults: a review. *Neuro-immunomodulation*, 15, 251–259.

Gougeon A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 17(2):121–55.

Govindaiah V, Naushad SM, Prabhakara K, Krishna PC, Radha Rama Devi A. 2008. Association of parental hyperhomocysteinemia and C677T methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with recurrent pregnancy loss. *Clin. Biochem*. 42 (March (4–5)), 380–386.

Gosálvez J, García-Ochoa C, Ruíz-Jorro M, Martínez-Moya M, Sánchez-Martín P, aballero PA. 2013. Qué Velocidad “muere” El ADN Del Espermatozoide Tras Descongelar Muestras Seminales Procedentes De Donantes? *Rev. Int. Androl*. 11, 85–93.

- Grujicic D, Milosevic Djordjevic O, Arsenijevic S, Marinkovic D. 2007. The effect of combined therapy with ritodrine, erythromycin and verapamil on the frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of pregnant women. *Clin. Exp. Med.* 7 (March (1)), 11–15.
- Grujicic D, Milosevic-Djordjevic O, Arsenijevic S, Marinkovic D. 2008. Treatment of pregnant women with a betamimetic and verapamil increases the micronuclei frequency in umbilical cord blood lymphocytes. *Tohoku J. Exp. Med.* 215 (August (4)), 363–371.
- Guérin J-F. 2016. Chapitre8 - La spermatogénèse. In: Frydman R, editor. *Infertilité*. Paris: Elsevier Masson, p 59–64.
- Haaf T. 2006. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 310:13-22.
- Hagelstrom RT, Askin KF, Williams AJ, Ramaiah L, Desaintes C, Goodwin EH, Ullrich RL, Bailey SM. DNA PKcs and ATM influence generation of ionizing radiation-induced bystander signals.
- Hamilton-Fairley D, Kiddy D, Watson H, Paterson C, Franks S. 1992. Association of moderate obesity with a poor pregnancy outcome in women with polycystic ovary syndrome treated with low dose gonadotrophin. *Br J Obst Gynaecol.* 99:128-31.
- Hanson C, Jakobsson AH, Sjogren A, Lundin K, Nilsson L, Wahlstro J, Hardarson T, StevicJj, Darnfors C, Janson PO, Wikland M, Hamberger L. Preimplantation genetic diagnosis (PGD): the Gothenburg experience. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80(4):331—6.
- Hansen D, Lou HC, Olsen J. 2000. Serious life events and congenital malformations: a national study with complete follow-up. *Lancet.* 356: 875-880.
- Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. 2008. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod.* 23(3):699–708.
- Harper PS. 2006. The discovery of the human chromosome number in Lund, 1955—1956. *Hum Genet.* 119:226—32.
- Harrison HR, Alexander ER, Weinstein L, Lewis M, Nash M, Sim DA. 1983. Cervical Chlamydia trachomatis and mycoplasmal infections in pregnancy. *Epidemiology and outcomes. JAMA.* 250: 1721-1727.
- Hart JA. 2005. Transvaginal ultrasound. In: Institute USNLatN (ed.) *Medline Plus. Trust Health information for you.* Philadelphia, PA: Medline Plus Medical Encyclopedia.
- Hassold T, 1986. Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. *Trends Genet.* 2, 105–110.
- Hassold T, Benham F, and Leppert M. 1988. Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. *Am. J. Hum. Genet.* 42, 534–541.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane JA, Jacobs PA. 1980. A cytogenetic study of 1000 abortions. *Ann Hum Genet* 44:151-164.
- Hassold T, Pettay D, Robinson A, and Uchida I. 1992. Molecular studies of parental origin and mosaicism in

- 45, X conceptuses. *Hum. Genet.* 89, 647–652.
- Heffner L, Schust D. 2014. *The Reproductive System at a Glance*, 4th Edition. Wiley.com.
- Held KR, Kerber S, Kaminsky E, Singh S, Goetz P, Seemanova E, Goedde HW. 1992. Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Hum. Genet*; 88, 288–294.
- Henderson CJ, Russell AL, Allan JA, Wolf CR. 1992. Sexual differentiation and regulation of cytochrome P-450 CYP2C7. *Biochim. Biophys. Acta*, 1118, 99–106.
- Hertz-Picciotto I, Swan SH, Neutra RR. 1992. Reporting bias and mode of interview in a study of adverse pregnancy outcomes and water consumption. *Epidemiology*. 3: 104-112.
- Heuser VD, de Andrade VM, Peres A, Gomes de Macedo Braga LM, Bogo Chies JA. 2008. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol. Int.* 32 (October (10)), 1223–1229.
- Hiatt BK, Lentz SR. 2002. Prothrombotic states that predispose to stroke. *Curr Treat Options Neurol.* 4(6):417-425.
- Hilali A, Anane R, Jaouani N, Creppy E, Verschaeve L. 2008. Cytogenetic analysis of tannery workers in Morocco, *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, vol. 28, pp. 439-442.
- Hill JA, Choi BC. 2000. Maternal immunological aspects of pregnancy success and failure. *J Reprod Fertil.* 55(Suppl):91–97.
- Ho HN, Gill T, Hsieh CY. 1991. The prevalence of recurrent spontaneous abortions, cancer, and congenital anomalies in the families of couples with recurrent spontaneous abortions and gestational trophoblastic tumors. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 165, 461–466.
- Holdcraft RW, Braun RE. 2004. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 27: 335–342.
- Holland N, Fucic A, Merlo DF, Sram R, Kirsch-Volders M. 2011. Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis*, 26: 51–56.
- Hook EB and Warburton D. 1983. The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and severity in genotypes associated with structural X abnormalities of mosaicism. *Hum. Genet.*; 64, 24–27.
- Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. 2003. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod.* 18:1660-1665.
- Horne AW, Alexander CI. 2005. Recurrent miscarriage. *J Fam Plann Reprod Health Care.* 31(2):103-7.
- Horsman DE, Dill FJ, McGillivray BC, Kalousek DK. 1987. X chromosome aneuploidy in lymphocyte cultures from women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Med Genet.* Dec;28(4):981-7.
- Hoshimoto K, Komine F, Hayashi M, Ohkura T. 2002. Plasma soluble Fas changes during early pregnancy and miscarriage. *Clin Chim Acta.* 323:157-160.

- Huber R, Braselmann H, Bauchinger M. Intra- and inter-individual variation of background and radiation induced micronucleus frequencies in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 1992;61:655– 6.
- Hugues JN. 2016. Chapitre2 - La folliculogenèse : le B.A.-BA pour le médecin de la reproduction. In: Frydman R, editor. *Infertilité*. Paris: Elsevier Masson, p 7–12.
- Hull MG, Glazener CM., Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, Coulson C, Lambert PA, Watt EM, Desai KM, 1985. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 291 (December (6510)), 1693–1697.
- Hussain R. 1998. The role of consanguinity and inbreeding as a determinant of spontaneous abortion in Karachi, Pakistan. *Annals of Human Genetics*62, 147–157.
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Sari- Minodier I, Baciuchka-Palmaro M, Botta A, Orsiere T. 2008. Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: a pooled reanalysis. *Mutat. Res.* 615:18–27.
- Iborra A, Palacio, JR, Martinez P. 2005. Oxidative stress and autoim-mune response in the infertile woman. *Chem. Immunol. Allergy* 88, 150–162.
- International Atomic Energy Agency. 2001. Biological dosimetry: chromosomal aberrations analysis for dose assessment. Technical Report Series No. 405. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.
- Ioan D, Duca-Marinescu D, Cioltei A, Maximilian C. 1978. Three women with 45,X/46,XX mosaic and multiple spontaneous abortions. *Endocrinologie*. Apr-Jun; 16(2): 139-4 1.
- Irva HP, Shanna HS, Raymond RN, Steven JS. 1989. Spontaneous abortions in relation to consumption of tap water: an application of methods from survival analysis to a pregnancy follow-up study. *American Journal of Epidemiology*, Volume 130, Issue 1, July 1989, Pages 79–93.
- Ishikawa H, Ishikawa T, Yamamoto H, Fukao A, Yokoyama K. 2007. Genotoxic effects of alcohol in human peripheral lymphocytes modulated by ADH1B and ALDH2 gene polymorphisms. *Mutat. Res.*,615, 134–142.
- Jablonowska B. 2003. Recurrent spontaneous abortion: a clinical, immunological and genetic study, Linköping University, Linköping.
- Jaber L, Merlob P, Gabriel R, Shohat M. 1997. Effects of consanguineous marriage on reproductive outcome in an Arab community in Israel. *J Med Genet.* 34: 1000–2.
- Jackson AL, Loeb L, 2001. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.* 477 (June (1–2)), 7–21.
- Jacobs PA, Hassold TJ, Matsuyama AM, Newlands IM. 1978. Chromosome constitution of gestational trophoblastic disease. *Lancet* 2, 49.
- Jain VK, Nalini P, Chandra R, Srinivasan S. 1993. Congenital malformations, Reproductive wastage and consanguineous mating. *Australia and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*33, 33–36.

- Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart L, Gores GJ. 2000. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangio-carcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res.* 60 (January (1)), 184–190.
- Jalbert P. 1983. Genetic counseling in reciprocal translocations. *J Genet Hum.* 36(1-2):3-14.
- James DS, Kristiansen CM. 1995. Women's reactions to miscarriage: the role of attributions, coping styles, and knowledge. *J Applied Soc Psychol.* 25:59—76.
- Jaruga P, Dizdaroglu M. 1996. Repair of products of oxidative DNA basedamage in human cells. *Nucleic Acids Res.* 24 (April (8)), 1389–1394.
- Jauniaux E, Poston L, Burton GJ, 2006. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum. Reprod. Update* 12 (November–December (6)), 747–755.
- Jeyapradha D, Saraswathi TR, Ranganathan K, Wilson K. 2011. Comparison of the frequency of sister chromatid exchange in pan chewers and oral submucous fibrosis patients. *J. Oral. Maxillofac. Pathol.*,15: 278-82.
- Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, YingDM, Jin F. 1997. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J. Natl. Cancer Inst.* 89 (February (3)), 238–244.
- Jivraj S, Anstie B, Cheong YC, Fairlie FM, Laird S, Li TC. 2001. Obstetric and neonatal outcome in women with a history of recurrent miscarriage: a cohort study. *Hum Reprod.* 16:102–06
- Johnson L, Zane RS, Petty CS, Neaves WB. 1984. Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. *Biol. Reprod.* 31: 785–795.
- Joosten H, van Acker F, Van den Dobbelen D, Horbach G, Krajnc E. 2004. Genotoxicity of hormonal steroids. *Toxicol. Lett.*, 151: 113–134.
- Jorde LB, Carey JC, White RL. 1995. Clinical cytogenetics: the chromosome basis of human disease, in: *Medical Genetics*, St. Louis, Mosby, p. 102.
- Kaare M. 2009. Genetic studies on recurrent miscarriage. *Folkhälsan Institute of Genetics and Department of Medical Genetics University of Helsinki, Helsinki, Finland.*
- Kallan JE. 1992. Effects of interpregnancy intervals on preterm birth, intrauterine growth retardation, and fetal loss. *Soc Biol.* 39: 231–45.
- Kallan JE. 1997. Reexamination of interpregnancy intervals and subsequent birth outcomes: evidence from U.S. linked birth/infant death records. *Soc Biol.* 44:205–12.
- Kalousek DK, Barrett IJ, and McGillivray BC. 1989. Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 338–343.
- Kalousek DK, Pantzar T, Tsai M, Paradise B. 1993. Early spontaneous abortion: morphologic and karyotypic

- findings in 3,912 cases. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 29:53-61.
- Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, and Mikamo K. 1993. Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation—air drying method. *Hum. Genet.* 90, 533–541.
- Kangatharan C, Labram S, Bhattacharya S. 2017. Interpregnancy interval following miscarriage and adverse pregnancy. *Human Reproduction Update*, Vol.23, No.2 pp. 221–231. outcomes: systematic review and meta-analysis.
- Katz VL, Kuller JA (1994). Recurrent miscarriage. *Am J Perinat.* 11:386-397.
- Kesmodel U, Wisborg K, Olsen SF, Henriksen TB, Secher NJ. 2002. Moderate alcohol in-take in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *Alcohol Alcohol.* 37: 87-92.
- Khan AS, Khan AR, Khan H. 1989. Comparative study of sensitivity and specificity of beta monoclonal agglutination inhibition and sandwich immunometric assay tests in the di-agnosis of pregnancy. *J Pak Med Assoc.* 39: 131-133.
- Khlat M. 1988. Consanguineous marriage and reproduction in Beirut, Lebanon. *Amercian Journal of Human Genetics.* 43, 188–196.
- Khoury SA, Massad DF. 2000 Consanguinity, fertility, reproductive wastage, Infant mortality and congenital malformations in Jordan. *Saudi Medical Journal.* 21, 150–154.
- Kiernan KE: Age at puberty in relation to age at marriage and parenthood: A national longitudinal study. 1977. *Ann Hum Bio* 4:301-308.
- Kim YJ, Hong YC, Lee KH, Park HJ, Park EA, Moon HS, HaEH. 2005. Oxidative stress inpregnantwomenand birthweight reduction. *Reprod. Toxicol.* 19 (March–April (4)), 487–492.
- Kircheisen R, Schroeder-Kurth T. 1991. Familiäres blasenmolen-syndrom und genetische aspekte dieser gestörten trophoblastentwicklung. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 51, 560–571.
- Kirkinen P, Jouppila P, Koivula A, Vuori J, Puukka M. 1983. The effect of caffeine on placental and fetal blood flow in human pre- gnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 147:939-42.
- Kirsch-Volders M, Plas G, Elhajouji A, Lukamowicz M, Gonzalez L, Vande Loock K, Decordier I. 2011.The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch Toxicol.* 85:873–99.
- Klebanoff MA, Levine R J, Der Simonian R, Clemens J D, Wilkins D G. 1999. Maternal serum paraxanthine, a caffeine metabolite, and the risk of spontaneous abortion. *The New England Journal of Medicine.* 341(22), 1639-1644.
- Kleinhaus K, Perrin M, Friedlander Y, Paltiel O, Malaspina Det, Harlap S. 2006. Paternal age and spontaneous abortion. *Obstet Gynecol.* 108: 369–77.
- Kline J, Stein Z. 1986. The epidemiology of spontaneous abortion. In *Early Pregnancy Failure* (Huisjes, H.J. and Lind, T. eds.), Churchill Livingstone, New York, pp. 240–256.
- Kline J. 1989. Conception to birth epidemiology of prenatal development. *Monographs in Epidemiology and*

Biostatistics. Oxford, Oxford University Press.

- Knibiehler Y. 1997. La révolution maternelle. Paris: Perrin. Kontic-Vucinic O, Terzic M, Radunovic N. 2008. The role of antioxidant vitamins in hypertensive disorders of pregnancy. *J. Perinat. Med.* 36 (4), 282–290
- Koteles GJ, Bojtor I, Szirmal S, Berces J, Otos M. 1993. Micronucleus frequency in cultured lymphocytes of an urban population. *Mutation Res.* 319:267–71.
- Kram D, Bynum GD, Senula GC, Schneider EL. 1979. In utero sister chromatid exchange analysis for the detection of transplacental mutagens. *Nature.* 279:531.
- de Kretser DM, Loveland K, O'Bryan M. 2016. Chapter 136 - Spermatogenesis. In: Jameson JL, De Groot LJ, de Kretser DM, Giudice LC, Grossman AB, Melmed S, Potts JT, Weir GC, editors. *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders, p 2325-2353.e9.
- de Kretser DM, Temple-Smith PD, Kerr JB. 1982. Anatomical and functional aspects of the male reproductive organs. In: Bandhauer K, Fricks J, editors. *Handbook of urology*. Berlin: Springer. C chapter 16, p. 1–31
- Kuhnert B, Nieschlag E. 2004. Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod update.* 10: 327–39.
- Kujovich JL. 2004. Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol.* 191:412-424.
- Kulkarni A, Wilson 3rd., D.M., 2008. The involvement of DNA-damage and -repair defects in neurological dysfunction. *Am. J. Hum. Genet.* 82 (March (3)), 539–566
- Kulkarni ML, Kurian M 1990 Consanguinity and its effects on fetal growth and development: a south Indian study. *Journal of Medical Genetics* 27, 348–352.
- Kunzle R, Mueller MD, Hanggi W, Birkhauser MH, Drescher H, Bersinger NA. 2003. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril.* 79:287–291
- Kuo PL. 2002. Maternal trisomy 21 mosaicism and recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 78:432–433.
- Labidi B, Gregoire M, Frack-owiak S, Hernandez-Verdun D, Bouteille, M. 1987. RNA polymerase activity in PtK1 micronuclei containing individual chromosomes. An in vitro and in situ study. *Exp. Cell. Res.,* 169: 233–244.
- Laget M. 1989. Naissances l'accouchement avant l'âge de la clinique. Paris: éditions du Seuil.
- Lanasa MC, Hogge WA, Kubik C, Blancato J, Hoffman EP. 1999. Highly skewed X-chromosome inactivation is associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Am J Hum Genet.* 65:252-254.
- Landi S, Barale R. 1999. Sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronuclei in female lymphocytes: correlations with biological rhythms, miscarriages and contraceptive pill use. *Mutagenesis* vol.14 no.6 pp.581–585.
- Larsson PG, Bergstrom M, Forsum U, Jacobsson B, Strand A, Wolner-Hanssen P. 2005. Bacterial vaginosis.

- Transmission, role in genital tract infection and pregnancy out-come: an enigma. *APMIS*. 113: 233-245.
- Lashen H, Ledger W, Lopes-Bernal A and Barlow D. 1999. Extreme of body mass index do not adversely affect the outcome of superovulation and in-vitro fertilisation. *Hum Reprod* 14,712±715.
- Laskin CA, Bombsrdier C, Hannah ME, Mandel FP, Ritchie JWK, Farewell V, Farine D, Spitzer K, Fielding L, Soloninka C, Yeung M. 1997. Prednisone and aspirin in women with autoantibodies and unexplained recurrent fetal loss. *N Eng J Med*. 337:148-153.
- Latt SA, Sckreck RR. 1980. Sister chromatid exchange analysis. *Am J Hum Genet*. 32:297-313.
- LaVecchia C, Franceschi S, Fasoli M, Mangioni C. 1982. Gestational trophoblastic neoplasms in homozygous twins. *Obstet. Gynecol*. 60, 250–252, 1982.
- Lazutka JR. 1991. Replication index in cultured human lymphocytes: methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environ Mol Mutagen*. 17(3):188-95.
- Lee RM, SilverRM. 2000. Recurrent pregnancy loss: summary and clinical recommendations. *Sem. Reprod. Med*. 18:433-440.
- Lefort G, Blanchet P, Chaze AM, Guardet A, Sarda P, Demaille J, Pellestor F. 2001. Cytogenetic and molecular study of a jumping translocation in a baby with Dandy-Walker malformation. *J Med Genet*. Jan;38(1):67-73.
- Leridon H. 1977. *Human Fertility*. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Lespinnasse J. North MO, Paravy C, B~nel MJ, Malzac P, Blouin JL. 2003. A balanced complex chromosomal rearrangement (BCCR) in a family with reproductive failwe. *Hum Reprod*. Oct;18(10):2058-66.
- Lespinnasse J. 2003. North MO, Paravy C, Brunel MJ, Malzac P, Blouin JL. Abalanced complex chromosomal rearrangement (BCCR) in a family with reproductive failwe. *Hum Reprod*. Oct; 18(10):2058-66.
- Levario-Carrillo M, SordoM, Rocha F, Gonzalez-Horta C, Amato D, Ostrosky-Wegman P. 2005. Micronucleus frequency in human umbilical cord lymphocytes. *Mutat. Res*. 586 (September (1)), 68–75.
- Levine JS, Branch DW, Rauch J. 2002. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 346(10):752-763.
- Leviton A, Cowan L. 2002. A review of the literature relating caffeine consumption by women to their risk of reproductive hazards. *Food Chem Toxicol*. 40: 1271-1310.
- Levy B, DUM TM, Hirschhom K, Kardon N. Jumping translocations in spontaneous abortions. 200. *Cytogenet Cell Genet*. 88(1-2):25-9.
- Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J. 2008. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst. Biol. Reprod. Med*. 54 (May–June (3)), 111–125.
- Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman EM, Laird S. 2002. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update*. 8:463-481.
- Liehr JG, Fang WF, Sirbasku DA, Ari-Ulubelen A. 1986. Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian

- hamsters. *J. Steroid Biochem.* 24, 353–356.
- Liestøl K. 1980. Menarcheal age and spontaneous abortion: a causal connection? *American Journal of Epidemiology.* Vol 111 | , Issue 6, 753-758.
- Lim CK, Cho JW, Song IO, Kang IS, Yoon YD, Jun JH. 2008. Estimation of chromosomal imbalances in preimplantation embryos from preimplantation genetic diagnosis cycles of reciprocal translocations with or without acrocentric chromosomes. *Fertil Steril.* Dec;90(6):2144-51.
- Lindenbaum RH, Bobrow M. 1975. Reciprocal Translocations in Man: 3:1 Meiotic Disjunction Resulting in 47 or 45 Chromosome Offspring. *Journal of Medical Genetics.* Mar; 12(1), 29-43.
- Lindor NM, Ney JA, Gaffey TA, Jenkins RB, Thibodeau SN, Dewald GW. 1992. A genetic review of complete and partial hydatidiform moles and nonmolar triploidy. *Mayo Clin. Proc.* 67, 791–799.
- Littlefield LG, Lever WE, Miller FL, Goh KO. 1975. Chromosome breakage studies in lymphocytes from normal women, pregnant women and women taking oral contraceptives. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 121, 976–980.
- Lope V, Pollan M, Fernandez M, de Leon A, Gonzalez MJ, Sanz JC, Iriso A, Perez-Gomez B, Gil E, Perez Meixeira AM, de Paz C, Cis-neros M, de Santos A, Asensio A, Astray J, Martinez M, Garcia JF, Lopez-Abente G, Garcia-Sagredo JM, Aragonés N. 2010. Cytogenetic status in newborns and their parents in Madrid: the Bio Madrid study. *Environ. Mol. Mutagen.* 51 (May (4)), 267–277.
- Lubs HA, Patil S, Kiniberling WJ, Brown J, Cohen M, Gerald P, Hecht F, Moorhead P, Myriantopoulos N, Summitt RL. 1979. Chromosomal abnormalities ascertained in the collaborative perinatal survey of 7 and 8 year old children. In Robinson A, Lubs HA, Bergsma D (eds): "Sex Chromosome Aneuploidy: Prospective Studies on Children." New York: Alan R. Liss, Inc., for The National Foundation-March of Dimes. BD: OAS XV (1): 191-202.
- Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM. 2004). Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum Reprod Update.* 10:3-18.
- Lyon MF. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 190:372-373.
- Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC. 2002. Conception to ongoing pregnancy: the 'blackbox' of early Pregnancy loss. *Hum Reprod Update.* 8(4):333-343.
- Madan K, Nieuwint AW, van Bever Y. 1997. Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. *Hum Genet.* Jun;99(6):806- 15
- Maconochie N, Doyle P, Prior S, R Simmons. 2007. Risk factors for first trimester miscarriage: results from a UK-population-based case-control study. *BJOG.* 114:170e86.
- Mackenzie W, Holmes MD, Newton JR. 1988. Spontaneous abortion rate in ultrasonographically viable pregnancies. *Obstet. Gynecol.* 71,81-83.
- Maes A, Hilali A, Léonard E, Léonard A, Verschaeve L. 1993. Stable chromosome aberrations 25 years after severe accidental radiation exposure. *Radiation and environmental biophysics,* vol. 32, pp. 319-324.

- Maffei F, Fimognari C, Castelli E, Stefanini GF, Forti GC, Hrelia P. 2000. Increased cytogenetic damage detected by FISH analysis on micronuclei in peripheral lymphocytes from alcoholics. *Mutagenesis*, 15, 517–523.
- Maloney CA, Rees WD. 2005. Gene nutrient interactions during fetal development. *Reproduction*, 130, 401–410.
- Malumbres M, Barbacid M. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Rev Cancer* 1: 222-31.
- Mamur S, Yuzbasioglu D, Unal F, Aksoy H. 2012. Genotoxicity of food preservative sodium sorbate in human lymphocytes in vitro. *Cytotechnology*. 64:553–562.
- Mandang S, Manuelpillai U, Wallace EM. 2007. Oxidative stress increases placental and endothelial cell activin A secretion. *J. Endocrinol.* 192 (March (3)), 485–493.
- MarconL, Boissonneault G. 2004. Transient DNA Strand Breaks during Mouse and Human Spermiogenesis: New Insights in Stage Specificity and Link to Chromatin Remodeling. *Biol. Reprod.* 70, 910–918.
- Maresh GA, Timmons TM, Dunbar BS. 1990. Effects of extracellular matrix on the expression of specific ovarian proteins. *Biol. Reprod.* 43: 965–976.
- Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. 2006. Chromosomal changes : induction, detection methods and applicability in human bio monitoring. *Biochimie*, 88: 1515–1531.
- McFadden DE, Kwong LC, Yam IYL, Langlois S. 1993. Parental origin of triploidy in human fetuses: evidence for genomic imprinting. *Hum. Genet.* 92, 465–469.
- Meek MEB, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE. 2003. A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Crit Rev Toxicol.* 33:591–653.
- Mehlmann LM. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 130: 791–799.
- Meijer L, Jezequel A, Ducommun B. 2000. *Progress in Cell Cycle Research*, vol. 4, Plenum Press, New York, 21: 248.
- Meijer L, Jezequel A, Roberge M. 2003. *Cell Cycle Regulators as Therapeutic Targets. Progress in Cell Cycle Research*, vol. 5, Editions —Life in Progress||, Roscoff. 54: 549.
- Menezo Jr Y, Russo G, Tosti E, El Mouatassim S, Benkhalifa M. 2007. Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes. *J Assist Reprod Genet.* Nov;24(11):513-20.
- Menezo Y, Dale B, CohenM. 2010. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote* 21 (July), 1–9.
- Migliore L, Parini M, Sbrana I, Biagini C, Battaglia A, Loprieno N. 1991. Micronucleated lymphocytes in people occupationally exposed to potential environmental contaminants: the age effect. *Mutation Res.* 256:13–20.

- Middendorff R, Muller D, Mewe M, Mukhopadhyay AK, Holstein AF, Davidoff MS. 2002. The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:3486–99.
- Migliore L., Scarpato, R., Coppede, F., Petrozzi, L., Bonuccelli, U, Rodilla, V. 2001. Chromosome and oxidative damage biomarkers in lymphocytes of Parkinson's disease patients. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 204, 61–66.
- Milja K. Genetic studies on recurrent miscarriage. 2009. Folkhälsan Institute of Genetics and Department of Medical Genetics University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinskas JG, Sykes A. 1980. Fetal loss after implantation. A prospective study. *Lancet* ;2(8194): 554–6
- Mills JL, Simpson JL, Driscoll SG, Jovanovic-Petersen L, Van Allen M, Aarons JH, Metzger B, Bieber FR, Knopp RH, Holmes LB. 1988. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N Eng J Med.* 319:1617-1623.
- Milosevic-Ethordevic O, Grujicic D, Marinkovic D, Arsenijevic S, Bankovic S. 2003. Effect of various doses of gestogens on micronuclei frequency in human peripheral blood lymphocytes of pregnant women. *Hum. Reprod.* 18 (February (2)), 433–436
- Minks J, Robinson WP, Brown CJ. 2008. A skewed view of X chromosome inactivation. *J Clin Invest.* 118:2023.
- Mishra GD, Dobson AJ, Schofield MJ. 2000. Cigarette smoking, menstrual symptoms and miscarriage among young women. *Aust N Z J Public Health.* 24: 413-420.
- Moomjy M, Colombero LT, Veeck LL, Rosenwaks Z, Palermo GD. 1999. Sperm integrity is critical for normal mitotic division and early embryonic development. *Mol Hum Reprod.* 5:836-844.
- Moore KL. 1982. *The Developing Human*, 3rd edn. W.B.Saunders, Philadelphia, pp. 70–109.
- Moore HD, Curry MR, Penfold LM, Pryor JP. 1992. The culture of human epididymal epithelium and in vitro maturation of epididymal spermatozoa. *Fertil Steril.* 58:776–83.
- Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Norman RJ, Fenech MF. 2008. Genome instability is increased in lymphocytes of women with polycystic ovary syndrome and is correlated with insulin resistance. *Mutat. Res.* 639, 55–63.
- Morita T, Hayashi M, Nakajima M, Tanaka N, Tweats DJ, Morikawa K, Sofuni T. 2009. Practical issues on the application of the GHS classification criteria for germ cell mutagens. *Regul Toxicol Pharmacol.* 55:52–68.
- Morris NM, Udry JR. 1967. Daily immunologic pregnancy testing of initially non pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 98, 1148–1130.
- Morssink LP, Sikkema-Raddatz B, Beekhuis JR, deWolf BT, Mantingh A. 1996. Placental mosaicism is associated with unexplained second-trimester elevation of MshCG levels, but not with elevation of MSAFP levels. *Prenat. Diagn.* 16, 845–851.

- Mortimer D. 1990. Objective analysis of sperm motility and kinematics. In: Keel BA, Webster BW, editors. Handbook of laboratory diagnosis and treatment of infertility. Boca Raton: CRC. P: 97–133.
- Mortimer D. 1983. Sperm transport in the human female reproductive tract. In: Finn CA, editor. Oxford reviews of reproductive biology. Oxford, UK: Oxford University Press. Chapter 5, p. 30–61.
- Morton NE, Chiu D, Holland C, Jacobs PA, Pettay D. 1987. Chromosome anomalies as predictors of recurrence risk for spontaneous abortion. *Am. J. Med. Genet.* 28: 353–360.
- Mruk DD, Cheng CY. 2015. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr. Rev.* 36: 564–591.
- Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L, Braham NJ, Saidi S, Finan RR, Almawi WY, Mahjoub T. 2006. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction.* 131:395-401.
- Müller EE, Locatelli V, Cella S, Penalva A, Novalli A, Cocchi D. 1983. Prolactin-lowering and releasing drugs: mechanisms of action and therapeutic applications. *Drugs.* 25 : 399–432.
- Muller F, Thibaud D, Poloce F, Gelineau MC, Bernard M, Brochet C, Millet C, Réal JY, Dommergues M. 2002. Risk of amniocentesis in women screened positive for Down syndrome with second trimester maternal serum markers. *Prenat Diagn.* 22: 1036–9.
- Muller W-U, Streffer C. Micronucleus assays. *Adv Mutagen Res* 1994;5:1–33.
- Munne S, Escudero T, Sandalinas M, Sable D, Cohen J. 2000. Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations. *Cytogenet Cell Genet.* 90:303-308.
- Murgia E, Ballardin M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R. 2008. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutat. Res.* 639, 27–34.
- Mutter GL (1997). Role of imprinting in abnormal human development. *Mutat Res.* 396:141-47.
- Mutter GL, Stewart CL, Chaponot ML, Pomponio RJ. 1993. Oppositely imprinted genes H19 and insulinlike growth factor 2 are coexpressed in human androgenic trophoblast. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 1096–1102.
- Natarajan AT, Boei JJWA, Darroudi F, Van Diemen PC, Dulout F, Hande MP, Ramalho AT. 1996. Current cytogenetic methods for detecting exposure and effects of mutagens and carcinogens. *Environ Health Perspect.* 104:145– 8.
- Nazari A, Check JH, Epstein RH, C Dietterich, S Farzanfar. 1991. Relationship of small dates sac size crown rump length and spontaneous abortion in patients with known date of ovulation. *Obstet. Gynecol.* 78,369.
- Nazmy NA. 2008. Cytogenetic studies of couples with reproductive failure in Alexandria, Egypt. *J. Egypt. Public Health Assoc.* 83 (3–4), 255–271.
- Neilson JP. 2001. Ultrasound for fetal assessment in early pregnancy (Cochrane Review). In *The Cochrane*

Library, Issue 2. Update Software, Oxford.

- Neri G, Serra A, Campana M, Tedeschi B. 1983. Reproductive Risks for Translocations: Cytogenetic Study and Analysis of Pregnancy Outcome in 58 Families. *American Journal of Medical Genetics*. 16, 535-561.
- Netter Frank H, Machado Carlos AG, Carter K. 2006. *Netter's Atlas of the Human Body* ISBN 0-7641-5884-8.
- Neuber M, Rehder H, Zuther C, Lettau R, and Schwinger E. 1993. Polyploidies in abortion material decrease with maternal age. *Hum. Genet*; 91: 563–566.
- Neugebauer R, Kline J, O'Connor P, Shrout P, Johnson J, Skodol A, Wicks J, Susser M. 1992. Depressive symptoms in women in the six months after miscarriage. *Am J Obstet Gynecol*. 166: 104-109.
- Newcomb WW, Rodriguez M, Johnson JW. 1991. Reproduction in the older gravida. A literature review. *J. Reprod. Med.*36, 839–845.
- Nielsen S, Hahlin M, Platz-Christensen J. 1999. Randomised trial comparing expectant with medical management for first trimester miscarriages. *Br J Obstet Gynaecol*. 106: 804-807.
- Nigro G, Mazzocco M, Mattia E, Di Renzo GC, Carta G, Anceschi MM. 2011. Role of the infections in recurrent spontaneous abortion. *J Matern Fetal Neonatal Med.*24:983-9.
- Norppa H, Falck G C. 2003. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*. 18, 221–233.
- Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. 2001. Implantation and the survival of early pregnancy. *NEngl J Med*. 345:1400-1408.
- Ntrivalas EI, Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Chung-Bang H, Ng SC, Beaman KD, Mantouvalos HP, Beer AE. 2001. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Hum Reprod*. 16(5):855-861.
- Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. 2000. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ*, 11: 1708–12.
- Oakeshott P, Hay P, Hay S, Steinke F, Rink E, Kerry S. 2002. Association between bacterial vaginosis or chlamydial infection and miscarriage before 16 weeks' gestation: pro-spective community based cohort study. *BMJ*, 325: 1334.
- Obe G, Beek B, Vaidya VG. 1975. The human leukocyte test system III. Premature chromosome condensation from chemically and x-ray induced micronuclei. *Mutat. Res.*, 27:89–101.
- Obe G, Pfeiffer P, Savage, Johannes JC, Goedecke W, Jeppesen P, Natarajan AT, Martínez-López W, Folle GA, Drets ME. 2002. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research*. Jul 25; 504: 17-36.
- Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K. 2000. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril*. 73: 300–4.
- Ogasawara M, Ozaki Y, Sato T, Suzumori N, Suzumori K. 2004. Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. *Fert Steril*. 81: 367–373.

- Ogilvie CM, Braude P, Scriven PN. 2001. Successful pregnancy out-comes after preimplantation genetic diagnosis (PGD) for carriers of chromosome translocations. *Hum Fertil (Camb)*. 4(3):168—71.
- Okon MA, Laird SM, Tuckerman EM, Li TC. 1998. Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertil Steril*. 69:682-690.
- Olivera, M., Darko, G., Dragoslav M., Slobodan, A. and Smilja, B. 2003. Effect of various doses of gestogens on micronuclei frequency in human peripheral blood lymphocytes of pregnant women. *Hum. Reprod.*, 18(2): 433-436.
- Olson SB, Magenis RE. 1988. Preferential paternal origin of de novo structural chromosome arrangements. In *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements* (Daniel, A., ed.), Alan R. Liss, New York, pp. 583–599.
- O'Neill GT and Kaufmann MH. 1987. Ovulation and fertilization of primary and secondary oocytes in LT/Sv strain mice. *Gamete Res*. 18, 27–36.
- Orgebin-Crist M. 1967. Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: fertilizing ability and embryonic mortality in does inseminated with epididymal spermatozoa. *Ann Biol Anim Biochim Biophys*. 7:373–9.
- Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122: 787–794.
- Osborn JF, Cattaruzza MS, Spinelli A. 2000. Risk of Spontaneous Abortion in Italy, 1978-1995, and the Effect of Maternal Age, Gravidity, Marital Status and Education. *American Journal of Epidemiology*. Jan 1; 151(1):98-105.
- Otani T, Roche M, Mizuike M, Colls P, Escudero T, Munné S. 2006. Preimplantation genetic diagnosis significantly improves the pregnancy outcome of translocation carriers with a history of recurrent miscarriage and unsuccessful pregnancies. *Reprod Biomed Online*. 13:869-874.
- Overstreet JW, Katz DF, Yudin AI. 1991. Cervical mucus and sperm transport in reproduction. *Semin Perinatol*. 15:149–55.
- Pandey MK, Rani R, Agrawal S. 2005. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet*. 272:95-108.
- Pandey MK, Thakur S, Agrawal S. 2004. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet*. 269:161-172.
- Parazzini F, Chatenoud L, Di Cintio E, Mezzopane R, Surace M, Zanconato G, Fedele L, Benzi G. 1998. Coffee consumption and risk of hospitalized miscarriage before 12 weeks of gestation. *Hum Reprod*. 13:2286-2291.
- Park VM, Gustashaw KM, Wathen TM. 1992. The presence of interstitial telomeric sequences in constitutional chromosome abnormalities. *Am J Hum Genet*. May;50(5):914-23.

- Parks JE, Ehrenwalt E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. In: Bavister BD, Cummins J, Raldon E. 1990. Fertilization in mammals. Norwell, MA: Serono Symposia.
- Pasinska M, Haus O, Adamczak R, Mucha B, Szymański W, Ferenc A, Ludwikowski G, Duszeńko E. 2005. The results of cytogenetic investigations in 107 couples with recurrent spontaneous abortions from Pomerania-Kujawy region of Poland. *Wiad Lek.* 58(11-12):630-5.
- Pedersen M, Wichmann J, Autrup H, Dang DA, Decordier I, Hvid-berg M, Bossi R, Jakobsen J, Loft S, Knudsen LE. 2009. Increased micronuclei and bulky DNA adducts in cord blood after maternal exposures to traffic-related air pollution. *Environ. Res.* 109 (November (8)), 1012–1020.
- Plouffe L, White EW, Tho SP, Sweet CS, Layman LC, Whitman GF, McDonough PG. 1992. Etiologic factors of recurrent abortion and subsequent reproductive performance of couples: Have we made any progress in the past 10 years? *Am J Obstet Gynecol.* 67:313-321.
- Pommier Y, Kohn KW. 2003. Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie: nouvelles cibles thérapeutiques. *Médecine/ Sciences.* 19: 173-86.
- Portnoi MF, Joye N, van den Akker J, Morlier G, Taillemite JL. Karyotypes of 1142 couples with recurrent abortion. 1988. *Obstet Gynecol.* Ju1;72(1):3 1-4.
- Potdar N, Konje JC. 2005. The endocrinological basis of recurrent miscarriages. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 17:424-428.
- Potdar N, Singh R, Mistry V, Evans MD, Farmer PB, Konje JC, Cooke MS. 2009. First trimester increase in oxidative stress and risk of small-for-gestational-age fetus. *BJOG* 116 (April (5)), 637–642.
- Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, Breit E, Berntorp E, Conard J, Fontcuberta J, Makris M, Mariani G, Noteboom W, Pabinger I, Legnani C, Scharrer I, van der Meer FJ. 1996. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet.* 348:913-916.
- Prigoshin N, Tambutti M, Larriba J, Gogorza S, Testa R. 2004. Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause. *Am J Reprod Immunol.* 52:36-41.
- Puck JM, Willard HF. 1998. X inactivation in females with X-linked disease. *N Engl J Med.* 338:325-328.
- Qian WP, Tan YM, Song D, Tan YQ, Lu GX. 2005. Cytogenetic study of 1780 cases of spontaneous abortion. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* Jun 30(3):258—60.
- Quenby, S. 2007. Recurrent miscarriage. *Obst. Gynaec. Reprod. Med.* 17(10):296-300.
- Rachootin P, Olsen J. 1982. Prevalence and socioeconomic correlates of subfecundity and spontaneous abortion in Denmark. *Int J Epidemiol.* 11:245e9.
- Rai R, Regan L. 2006. Recurrent miscarriage. *Lancet.* 368:601-611.
- Raimondi S, Garte S, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Lyubomirova K, Taioli E, Singh R, Farmer PB. 2007. Effects of diet on biomarkers of exposure and effects, and on oxidative damage. *Mutat. Res.* 620 (July(1–2)), 93–102.
- Raman RS, Chan PJ, Corselli JU, Patton WC, Jacobson JD, Chan SR, King A. 2001. Comet assay of cumulus cell

- DNA status and the relationship to oocyte fertilization via intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 16 (May (5)), 831–835
- Rand JH, Wu X-X, Andree HA, Lockwood CJ, Guller S, Scher J, Harpel PC. 1997. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome- a possible thrombogenic mechanism. *N Eng J Med.* 337(3):154-160.
- Rao PSS, Inbaraj SG. 1977. Inbreeding effects on human reproduction in Tamil Nadu, South India. *Annals of human genetics*, 41:87-98.
- Reddy Thavanati PK, Kanala KR, de Dios AE, Cantu Garza JM. 2008. Age-related correlation between antioxidant enzymes and DNA damage with smoking and body mass index. *J. Gerontol. A: Biol. Sci. Med. Sci.* 63 (April (4)), 360–364.
- Reagan LJ. 2003. From hazard to blessing to tragedy: representations of miscarriage in twentieth-century America. *Feminist Studies.* 29:356—78.
- Regan L, Braude PR, Trembath PL. 1989. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ.* 299: 541–45.
- Reik W, Dean W. 2001. DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis.* 22:2838-2843.
- Reik W, Dean W, Walter J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 293:1089-1093.
- Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P, Ruecker AV. 1998. Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Commun.* 245(3):933-938.
- Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. 2003. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 361:901–908.
- Rickman L, Fiegler H, Shaw-Smith C, Nash R, Cirigliano V, Voglino G, Ng BL, Scott C, Whittaker J, MAdinolfi M, Carter NP, Bobrow M. 2006. Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH, *J Med Genet*, vol. 43, n° 4, p. 353–61.
- Risch HA, Weiss NS, Clarke EA and Miller AB. 1990. Risk factors for spontaneous abortion and its recurrence. *Am J Epidemiol.* 131,570-573.
- Roberts CP, Murphy AA (2000). Endocrinopathies associated with recurrent pregnancy loss.
- Roberts J, Lowe, R. 1973. Where have all the conceptions gone? *Lancet*, i, 498–300. *Semin Reprod Med.* 18:357–362.
- Robinson WP, Binkert F, Bernasconi F, Lorda-Sanchez I, Werder EA, Schinzel AA. 1995. Molecular studies of chromosomal mosaicism: relative frequency of chromosome gain or loss and possible role of cell selection. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 444–451.
- Rochat RW, Koonin LM, Atrash HK, Jewett JF. 1988. Maternal mortality in the United States: report from the Maternal Mortality Collaborative. *Obstet Gynecol.* Jul;72(1):91-7.

- Roegiers L. 2003. *La grossesse incertaine*. Paris: Presses Universitaires de France.
- Roubicek DA, Gutierrez-Castillo ME, Sordo M, Cebrian-Garcia ME, Ostrosky-Wegman P. 2007. Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutat. Res.*, 631, 9–15.
- Rosemary T, Vivien A, Greenwood R, Richard G, Philip H, Michael S, Katharine S. 2002. Association between outcome of pregnancy and glycaemic control in early pregnancy in type I diabetes: population based study.
- Rossant J, Cross JC. 2001. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet.* 2:538-548.
- Rossner P, Boffetta P, Ceppi M, Bonassi S, Smerhovsky Z, Landa K, Juzova D, Sram R J. 2005. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ. Health Perspect.*, 113, 517–520.
- Roth D, Grazi RV, Lobel SM. 2003. Extremes of body mass index do not affect first trimester pregnancy outcomes in patients with infertility. *Am J Obstet Gynaecol* 188,1169-1170.
- Rubio C, Simon C, Blanco J, Vidal F, Minguez Y, Egozcue J, Crespo J, Remohi J, Pellicer A.1999. Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet.* 16:253-258.
- Rutstein SO, Johnson K, Conde-Agudelo A, Rosas-Bermudez A. 2005. Effect of Birth Spacing on Infant and Child Mortality: A Systematic Review and Meta-analysis. Technical document. Washington, DC: Catalyst Consortium.
- Ruzzi L, Ciarafoni I, Silvestri L, Semeraro ML, Abeni D. 2005. Association of PLA2 polymorphism of the ITGB3 gene with early fetal loss. *Fertil Steril.* 83:511-512.
- Saad FA, Jauniaux E. 2002. Recurrent early pregnancy loss and consanguinity. *Reprod BioMed Online.* 2: 167–70.
- Sachs ES, Jahoda MG, Van Hemel JO, Hoogeboom N, Sandkuyl LA. 1985. Chromosome studies of 500 couples with two or more abortions. *Obstet Gynecol.* Mar;65(3):375-8.
- Sacks GP, Studena K, Sargent K, Redman CW. 1998. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 179, 80–86.
- Sadeu JC, Nogueira D. 2011. Folliculogenesis and oogenesis in vivo and in vitro, in humans females. In: Poncelet C, Sifer C, editors. *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*. Paris: Springer, p 3–23.
- Sadler TW, Langman J, Leland J. 2006. *Langman's Medical Embryology*. 10 th edition, published by Lippincott Williams and Wilkins.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. 2002. Nature of DNA Damage in Ejaculated Human Spermatozoa and the Possible Involvement of Apoptosis. *Biol. Reprod.* 66, 1061–1067.
- Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ. 2003. Negative

effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril.* 79(Suppl 3):1597–1605.

- Samanta S, Dey P. Micronucleus and its applications. *Diagn Cytopathol* 2012;40:84–90.
- Sankoff D, Deneault M, Turbis P, Allen C. 2002. Chromosomal distributions of breakpoints in cancer, infertility, and evolution. *Theor. Popul. Biol.* 61: 497–501.
- Santos F, Dean W. 2004. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction.* 127:643-651.
- Sariola H, Frilander M, Heino T, Jernvall J, Partanen J, Sainio K, Salminen M, Thesleff I. 2003. 1st edition, published by Gummerus Kirjapaino Oy.
- Sawan C, Vaissiere T, Murr R, Herceg Z. 2008. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat. Res.* 642 (July (1–2)), 1–13.
- Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter DH, Martin CL. 2004. Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet.* 74:1168–74.
- Schnorr TM, Grajewski BA, Hornung RW, Thun MJ, Egeland GM, Murray WE, Conover DL, Halperin WE. 1991. Video display terminals and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med.* 324: 727-733.
- Scholl TO. 2008. Maternal nutrition before and during pregnancy. *Nestle Nutr. Workshop Ser Pediatr. Program,* 61, 79–89.
- Schull WJ, Furusho T, Yamamoto M, Komatsu I. 1974. The effect of parental consanguinity and inbreeding in Hirado, Japan. IV. Fertility and reproductive compensation. *Humangenetik.* 9:294-315.
- Schupp N, Schmid U, Rutkowski P, Lakner U, Kanase N, Heidland A, Stopper H. 2007. Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 292, F1427–F1434.
- Sears, D.A. and Udden, M.M. 2011. Howell–Jolly bodies: a brief historical review. *Am. J. Med. Sci.,* 343: 407–409.
- Sedelnikova OA, Nakamura A, Kovalchuk O, Koturbash I, Mitchell SA, Marino SA. 2007. DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbe irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer Res.* 67: 4295–4302.
- Serrano F, Lima ML. 2006. Recurrent miscarriage: Psychological and relational consequences for couples. *Psychology and Psychotherapy: Theory, Research and Practice.* 79, 585–594.
- Seshardi R, Baker E, Sutherland G. 1982. Sister chromatid exchange (SCE) analysis in mothers exposed to DNA damaging agents and their newborn infants, *Mutat Res.* 97:139-146.
- Setchell BP. 2008. Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 636: 212–233.

- Sharma T, Das BC. 1983. Higher incidence of spontaneous sister chromatid exchanges (SCEs) and X-ray induced chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes during pregnancy. *Mutat. Res.* 174: 27–33.
- Sharpe RM, Fraser HM, Brougham MFH, McKinnell C, Morris KD, Kelnar CJH, Wallace WHB, Walker M. 2003. Role of the neonatal period of pituitary-testicular activity in germ cell proliferation and differentiation in the primate testis. *Hum. Reprod.* 18: 2110–2117.
- Shaw M W: *Annu. Rev. Med.* 21: 409, 1970.
- Shiverick KT, Salafia C. 1999. Cigarette smoking and pregnancy I: ovarian, uterine and pla-cental effects. *Placenta.* 20: 265-272.
- Shubber EK, Hamamy HA, Al-Allak BM, Kalil AH. 1991. Sister chromatid exchange in lymphocytes from infants with Down's syndrome. *Mutat Res.* 248:61-72.
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. 2005. Pre-eclampsia. *Lancet*, 365, 785–799.
- Siddiqui IA, Jaleel A, Tamimi W, Al Kadri HM. 2010. Role of oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Arch. Gynecol. Obstet.* 282 (November (5)), 469–474.
- Siddique Y, Beg T, Afzal M. 2005. Antigenotoxic effects of ascorbic acid against megestrol acetate induced genotoxicity in mice. *Hum. Exp. Toxicol.* 24: 121–127.
- Simerly C, Wu GJ, Zoran S, Ord T, Rawlins R, Jones J, Navara C, Gerrity M, Rinehart J, Binor Z. 1995. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. *Nat Med.* 1:47-52.
- Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SE. 2010. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum. Reprod.* 25 (July (7)), 1594–1608.
- Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell D. 2017. A Systematic Review and Meta-Analysis to Determine the Effect of Sperm DNA Damage on in vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection Outcome. *Asian J. Androl.* 19, 80–90.
- Simpson JL. 1986. Genetics. CREOG Basic Science Monograph in Obstetrics and Gynecology. Council on Resident Education in Obstetrics and Fynecology, Washington,
- Skoner JM, Sigmon J, Larcom LL. 1995. Suppressed DNA repair capacity of peripheral lymphocytes in pregnant women. *Mol. Cell. Endocrinol.* 108, 179–183.
- Slama R, Bouyer J, Windham G, Fenster L, Werwatz A, SwanSH. 2005. Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion. *Am J Epidemiol.* 1: 816–23.
- Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jørgensen N, Horte A, Irvine S, Suominen J, Anderson AG, Auger J, Vierula M, Toppari J, Andersen AN, Keiding N, Skakkebaek NE, Spira A, Jouannet P. 2002. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum. Reprod.* 17, 303–313.
- Soares SR, Simon C, Remohi J, Pellicer A: Cigarette smoking affects uterine receptiveness. 2007. *Hum Reprod.* 22:543–547.

- Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109: 323–330.
- Soh K, Yajima A, Ozawa N, Abe Y, Takabayashi T, Sato S, Sou S, Suzuki M. 1984. Chromosome analysis in couples with recurrent abortions. *Tohoku J Exp Med.*44:151–63.
- Song EY., Rizvi SM, Qu CF, Raja C, Yuen J, Li Y, Morgenstern A, Apostolidis C, Allen BJ. 2008. The cytokinesis block micronucleus assay as a biological dosimeter for targeted alpha therapy. *Phys. Med. Biol.*, 53, 319–328.
- Srb V, Puza V. 1975. Methods for the analysis of human chromosome aberrations (author's transl).*Cas. Lek. Cesk.* 114, 231–236.
- Stenchever MA, Jarvis JA, Macintyre MN. 1968. Cytogenetics of habitual abortion. *Obstet Gynecol.* Oct; 32(4):548-55.
- Stene J, Stengel-Rutkowski S. 1982. Genetic Risks for Familial Reciprocal Translocations with Special Emphasis on Those Leading to 9p, 10p, 12p, trisomies. *Annals of Human Genetics*, 46, 41-47.
- Stephano L Roberto B. 1999. Sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronuclei in female lymphocytes : correlations with biological rhythms, miscarriages and contraceptive pill use. *Mutagenesis*, 14(6): 581-585.
- Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. 2002. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case control study. *Hum Reprod*; 17: 446–51
- Stephenson M, Kutteh W. 2007. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol.* 50:132-145.
- Stephenson MD, Sierra S. 2006. Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Hum Reprod.* 21(4):1076—82.
- Stern JJ, Dorfman AD, Gutierrez-Najar AJ, Cerrillo M, Coulam CB. 1996. Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril.* 65:250-253.
- Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA.2003. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Biol.* 24: 139-45.
- Stirtzinger RM, Robinson GE, Stewart DE, Ralevski E. 1999. Parameters of grieving in spontaneous abortion. *Int J Psychiatry Med.* 29:235—49.
- Stoll C, Alembick Y, Roth MP, Dott B. 1999 Parental consanguinity as a cause for increased incidence of birth defects in a study of 238,942 consecutive births. *Annals of Genetics.* 42, 133–139.
- Stray-Pedersen B, Stray-Pedersen S. 1984. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol.* 148:140-146.
- Strobino B, Fox HE, Kline J, Stein Z, Susser M, Warburton D. 1986. Characteristics of women with recurrent

- spontaneous abortions and women with favourable reproductive histories. *Am J Public Health*. 76:986–91.
- Subit I. 1980. Reciprocal translocation with special reference to reproductive failure. *Hum Genet* 55: 303-307.
- Surrey ES, Silverberg KM, Surrey MW, Schoolcraft WB. 2002. Effect of prolonged gonadotropin-releasing hormone agonist therapy on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer in patients with endometriosis. *Ferti.I Steril*. 78(4):699-704.
- Suryanarayana V, Rao L, Kanakavalli M, Padmalatha V, Deenadayal M, Singh L. 2006. Recurrent early pregnancy loss and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms. *Arch Gynecol Obstet*. 274:119-124.
- Swales AK, Spears N. 2005. Genomic imprinting and reproduction. *Reproduction*. 130:389-399.
- Syed V, Gérard N, Kaipia A, Bardin CW, Parvinen M, Jégou B. 1993. Identification, ontogeny, and regulation of an interleukin-6-like factor in the rat seminiferous tubule. *Endocrinology* 132: 293–299.
- Szulman AE. 1984. Syndromes of hydatidiform moles: partial vs. complete. *J. Reprod. Med*. 11, 788–791.
- Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T, Ohira S, Kon-ishi I. 2004. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows Arch*. 444 (January (1)), 49–55.
- Takakuwa K, Adachi H, Hataya I, Ishii K, Tamura M, Tanaka K. 2003. Molecular genetic studies of HLA-DRB1 alleles in patients with unexplained recurrent abortion in the Japanese population. *Hum Reprod*. 18:728-733.
- Tal J, Kaplan M, Sharf M, Barnea ER. 1991. Stress-related hormones affect human chorionic gonadotrophin secretion from the early human placenta in vitro. *Hum Reprod*. 6:766-769.
- Tatone C. Oocyte senescence: a firm link to age-related female subfertility. 2008. *Gynecol Endocrinol*. 24: 59–63.
- Tay SK, Shanske S, Kaplan P, DiMauro S. 2004. Association of mutations in SCO2, a cytochrome c oxidase assembly gene, with early fetal lethality. *Arch Neurol*. 61:950-952.
- Taylor JH. Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. 1957. Department of Botany, Columbia University, New York. August 14.
- Terzioglu F. 2001. Investigation into effectiveness of counseling on assisted reproductive techniques in turkey. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 22:133–141.
- Tharapel AT, Tharapel SA, Bannerman RM. 1985. Recurrent pregnancy losses and parental chromosome abnormalities: *Br J Obstet Gynaecol*. Sep;92(9):899- 914.
- Thomas JH. 1995. Genomic imprinting proposed as a surveillance mechanism for chromosome loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 480–482.
- Thomas P, Meizel S. 1989. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm

stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca^{2+} influx. *Biochem J.* 264:539–46.

- Thybaud V, Aardema M, Clements J, Dearfield K, Galloway S, Hayashi M, Jacobson-Kram D, Kirkland D, MacGregor JT, Marzin D, Ohshima W, Schuler M, Suzuki H, Zeiger E, Expert Working Group on Hazard Identification and Risk Assessment in Relation to In Vitro Testing. 2007. Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. *Mutat Res.* 627:41–58.
- Tian Y, Ishikawa H, Yamauchi T. 2000. Analysis of cytogenetic and developmental effects on pre implantation, mid-gestation and near-term mouse embryos after treatment with trichlorfon during zygote stage. *Mutat. Res.* 471 (November (1–2)), 37–44.
- Toyota M, Suzuki H. 2010. Epigenetic drivers of genetic alterations. *Adv. Genet.* 70, 309–323.
- Tredway DR, Settlege DS, Nakamura RM, Motoshima M, Umezaki CU, Mishell Jr DR. 1975. Significance of timing for the postcoital evaluation of cervical mucus. *Am J Obstet Gynecol.* 121:387–93.
- Trkova M, Kapras J, Bobkova K, Stankova J, Mejsnarova B. 2000. Increased micronuclei frequencies in couples with reproductive failure. *Reprod. Toxicol.* 14 (July–August (4)), 331–335.
- Tucker J, Preston R. 1996. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.* 365: 147–159.
- Tucker M, Cohen J, Gianaroli L. 1997. Treatment related chromosome abnormalities in human embryos. *Hum. Reprod.* 12: 780-784.
- Tucker JD, Nath J, Hando JC. 1996. Activation status of the X chromosome in human micronucleated lymphocytes. *Hum. Genet.* 97, 471–475.
- Tulpala M, Palosuo T, Ramsay T, Miettinen, Salonen R, Ylikorkala O. 1993. A prospective study of 63 couples with history of recurrent spontaneous abortion: contributing factors and outcome of subsequent pregnancies. *Hum Reprod.* 8:764-770.
- Tunaley JR, Slade P, Duncan SB. 1993. Cognitive processes in psychological adaptation to miscarriage: a preliminary report. *Psychol Health.* 8:369—81.
- Turleau C, Chabin-Colin F, de Grovehy J. 1979. Cytogenetic investigation in 413 couples with spontaneous abortions, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* Apr (9): 65–74.
- Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Sato Y, Fujimori K, Okamura K. 2001. Preferential X-chromosome inactivation in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 76:908-914.
- Umegaki K, Fenech M. 2000. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis.* 15, 261–269.
- Utani K, Kohno Y, Okamoto A, Shimizu N. 2010. Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress. *PLoS. ONE.*, 5(4).
- Van Blerkom J. 1996. Sperm centrosome dysfunction: a possible new class of male factor infertility in the

- human. *Mol Hum Reprod.* 2:349-354.
- Van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbema JD, te Velde ER, Karbaat J. 1991. Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *Br. Med. J.* 302, 1361–1363.
- Vanorny DA, Prasasya RD, Chalpe AJ, Kilen SM, Mayo KE. 2014. Notch signaling regulates ovarian follicle formation and coordinates follicular growth. *Mol. Endocrinol.* 28: 499–511.
- Venners SA, Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, Huang A, Ryan L, O'Connor J, Lasley B, Overstreet J, Wilcox A, Xu X. 2004. Paternal smoking and pregnancy loss: a prospective study using a biomarker of pregnancy. *Am J Epidemiol.* 159:993–1001.
- Vermeesch JR, Petit P, Speleman F, Devriendt K, Fryns JP, Marynen P. 1997. Interstitial telomeric sequences at the junction site of a jumping translocation. *Hum Genet.* Jun; 99(6):735-7.
- Viloria T, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. 2007. Sperm selection by swim-up in terms of deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test is altered in heavy smokers. *Fertil Steril.* 88:523–525
- Vinson RK, Hales BF. 2002. DNA repair during organogenesis. *Mutat. Res.*, 509: 79–91.
- Vitiello D, Patrizio P. 2007. Implantation and early embryonic development: implications for pregnancy. *Semin Perinatol.* 31:204-207.
- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Grone HJ, Jung A, Engel W, Haidl G. 1996. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 5:933-943.
- Von Linsingen R, Bompeixe EP, Bicalho G. 2005. A case-control study in IL6 and TGFB1 gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion in southern Brazilian patients. *Am J Reprod Immunol.* 53:94-99.
- Wakui K, Tanemura M, Suzumori K, Hidaka E, Ishikawa M, Kubota T, Fukushima Y. 1999. Clinical applications of two-color telomeric fluorescence in situ hybridization for prenatal diagnosis: identification of chromosomal translocation in five families with recurrent miscarriages or a child with multiple congenital anomalies. *J Hum Genet.* 44(2):85-90.
- Waller K, Swan SH, DeLorenze G, Hopkins B. 1998. Trihalomethanes in drinking water and spontaneous abortion. *Epidemiology.* 9: 134-140.
- Wang H, Dey SK. 2006. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet.* 7:185-199.
- Wang JX, Davies M and Norman RJ. 2000. Body mass and probability of pregnancy during assisted reproduction treatment: retrospective study. *BMJ.* 321,1320-1321.
- Wang JX, Davies MJ, Norman RJ. 2002. Obesity increases the risk of spontaneous abortion during infertility treatment. *Obes Res.* 10:551-554.
- Wang X, Lin Q, Ma Z, Hong Y, Zhao A, Di W, Lu P. 2005. Association of the A/G polymorphism at position 49

in exon 1 of CTLA-4 with the susceptibility to unexplained recurrent spontaneous abortion in the Chinese population. *Am J Reprod Immunol.* 53:100-105.

- Warburton D, Byrne J, and Canki N. 1991. *Chromosome Anomalies and Prenatal Development: An Atlas.* Oxford Monographs on Medical Genetics No. 20. Oxford University Press, New York.
- Warburton D, Kline J, Stein Z, Hutzler M, Chin A, Hassold T. 1987. Does the karyotype of a spontaneous abortion predict the karyotype of a subsequent abortion? Evidence from 272 women with two karyotyped spontaneous abortions. *Am. J. Hum. Genet.* 41, 465–483.
- Ward BE, Henry GP, Robinson A. 1980. Cytogenetic studies in 100 couples with recurrent spontaneous abortions. *Am J Hum Genet.* Jul;32(4):549-54.
- Warren JE, Silver RM. 2008. Genetics of pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol.* 51:84-95.
- Warsop A, Ismail K, Iliffe S. 2004. Explanatory models associated with psychological morbidity in first trimester spontaneous abortion: a generalist study in a specialist setting. *Psychol Health Med.* 9:306–14.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today.* 14(7):353-356.
- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC. 1988. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med.* 319(4):189-194.
- Williams D L, Hagen A A, Runyan J W, Jr.: *J. Lab. Clin. Med.* 77:417, 1971.
- Windham GC, Von Behren J, Fenster L, Schaefer C, Swan SH. 1997. Moderate maternal alcohol consumption and risk of spontaneous abortion. *Epidemiology.* 8: 509-514.
- Windham GC, Von Behren J, Waller K, Fenster L. 1999. Exposure to environmental and mainstream tobacco smoke and risk of spontaneous abortion. *Am J Epidemiol.* 149:243–7.
- Wingate L. 1965. Chromosome abnormality as a possible cause of habitual abortion. *Bristol Med Chir J.* Jan;80:5-6.
- Witchi E. 1948. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contrib Embryol Carnegie Inst* 32: 67–80.
- Wolf S, Perry P. 1976. Differential Giemsa staining of sister chromatid and the study of sister chromatid exchange without autoradiography. *Chromosoma.* 48:334-353.
- World Health Organization. 1987. Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int J Androl.* 7:1–53.
- Wu FY, Wu HD, Yang HL, Kuo HW, Ying JC, Lin CJ, Yang CC, Lin LY, Chiu TH, Lai JS. 2007. Associations among genetic susceptibility, DNA damage, and pregnancy outcomes of expectant mothers exposed to environmental tobacco smoke. *Sci. Tot. Environ.* 386 (November (1–3)), 124–133.
- Wu RC, Kuo PL, Lin SJ, Liu CH, Tzeng CC. 1993. X chromosome mosaicism in patients with recurrent abortion or premature ovarian failure. *J Formos Med Assoc.* Nov; 92(11):953-6.

- Xu J, Gridley T. 2013. Notch2 is required in somatic cells for breakdown of ovarian germ-cell nests and formation of primordial follicles. *BMC Biol.* 11: 13.
- Yakut S, Berker-Karauzum S, Simsek M, Zorlu G, Trak B, Luleci G. 2002. Telomere- specific fluorescence in situ hybridization analysis of couples with five or more recurrent miscarriages. *Clin Genet.* Jan;61(1):26-31.
- Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, Sakuragi N, Fujimoto S. 2001. High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol.* 46(2):132-136.
- Yamamoto M, Wantanabe G. 1979. Epidemiology of gross chromosome anomalies at the early stage of pregnancy. *Contrib. Epidemiol.* 1, 101–106.
- Yassin KM. 2000. Incidence and socioeconomic determinants of abortion in rural Upper Egypt. *Public Health*114, 269–272.
- Yuce H, Tekedereli I, Elyas H. Cytogenetic results of recurrent spontaneous abortions in Turkey. 2007. *Med Sci Monit.* 13(6):CR286-9.
- Yu MY, Chen YL, Qiu J. 2002. Cytogenetic analysis on patients with a history of spontaneous abortion. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 31(5):375-8.
- Young JM, McNeilly AS. 2010. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* 140: 489–504.
- Yusuf R, Naeem R .1997. Personal communication ;258:818–21.
- Zeleznik AJ. 2004. The physiology of follicle selection. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 31.
- Zenzes M. 2000. Smoking and Reproduction: Gene Damage to Human Gametes and Embryos. *Hum. Reprod. Update.* 6, 122–131.
- Zhang M, Su Y-Q, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. 2010. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science.* 330: 366–369.
- Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'ConnorJ, Selevan SG.1996. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril.* 65(3):503-509.
- Zini A and Agarwal A. 2011. *Biological and Clinical applications in Male Infertility and Assisted Reproduction,* Springer Science + Business Media1.
- Zlotogora J. 1997 Genetic disorders among Palestinian Arabs: Effects of consanguinity. *American Journal of Medical Genetics*68, 472–475.

ANNEXES

ANNEXES

Préparation des solutions:

1-Préparation du Milieux de culture cellulaire des lymphocytes:

Pour la préparation de 500 mL du milieu:

RPMI 1640.....	500mL
Bicarbonate de sodium 0,6g.....	500mL
Sérum de veau fœtale (15%) 75mL.....	500mL
Phytohémagglutinine(PHA) (1,5%) 10mL.....	500mL
Antibiotique (Pénicilline /Streptomycine) 3,96mL.....	500mL

- Ajuster le PH à 7,7.
- Filtration du milieu à l'aide du filtre millipore 0,22 µm sous la hotte à flux laminaire.
- Répartir 5mL du milieu dans chaque tube de la culture cellulaire.
- Conserver les tubes à 4°C.

2- Préparation de la solution de PBS pour l'extrait soluble:

- Dissoudre dans 1litre d'eau distillée:

-5gNaCl	-1,44gNa ₂ HPO ₄
-0,2gKCl	-0,2gKH ₂ PO ₄

Ajuster le PH à 7,4

3-Préparation de la solution de PHA:

- Mélanger 5 mg de la phytohémagglutinine (PHA) (1%) avec 12,5 du milieu RPMI1640.

4-Préparation de la solution de KCl :

- Dissoudre 5,6g de la poudre de KCl (0,075M) dans 1000mL d'eau distillée.

5-Préparation du colorant Giemsa:

- Mettre 5% du colorant Giemsa dans l'eau distillée.

6-Préparation de la solution saline de citrate (SSC):

Pour préparer 1 litre de cette solution il faut mélanger les deux solutions suivantes :

- Solution A : dissoudre 8.765g de NaCl dans 500mL d'eau distillé.
- Solution B : dissoudre 4.45g de C₆H₅ Na₃O₇ dans 500mL d'eau distillé.

7- Préparation de la solution de PBS pour la coloration:

Pour préparer 1 litre de cette solution peser :

- 8g NaCl.
- 0,2 g KCl.
- 2,16g Na₂HPO₄.7H₂O.
- 0,1g CaCl₂
- 0,1g MgCl₂.6H₂O.

8- Préparation de la solution Hoescht:

Pour préparer 100 mL : ajouté 2ml de la solution mère d'hoesch dans 98mL de la solution de PBS.

FICHE D'EXPLOITATION

I. IDENTIFICATION DE LA FEMMEE :

- AGE :
- SITUATION FAMILIALE :
- NIVEAU SOCIO-ECONOMIQUE :
- LIEU RESIDENCE : URBAIN RURAL
- STATUT INTELECTUEL :
- PROFESSION :
- COUVERTURE SANITAIRE :

AUTRES :

II. ANTECEDANTS :

↳ GYNECO-OBSTETRICAUX :

- AGE DES 1^{ÈRES} REGLES:
- AGE MARIAGE
- NOTION CONSANGUINITE
- CARACTERE CYCLE MENSTRUEL : REGULIER OUI NON
- GESTITE : • PARITE : • AGE 1^{ÈRE} GROSSESSE :
- FC : EV : MFIU : DECEC NOENATAL : MORT NE : DECES INFANTIL :
- TRAITEMENT PRIS GROSS : TTT DE FC : SEJOUR HOSPITALIER : AG : ECHO :
- OEUG CLAIR GROSS ARRETEE:
- DI : DP:
- GEU : OUI NON
- MOLE HYDATIFORME OUI NON
- ACCOUCHEMENT VOIE BASSE OUI NON
- ACCOUCHEMENT PAR CESARIENNE OUI NON
- ALLAITEMENT AU SEIN : OUI NON DUREE
- CONTRACEPTION ORALE: OUI NON DUREE
- IST : OUI NON

- KYSTE OVARIEN : OUI NON
- FIBROME : OUI NON
- POLYPE UTERIN : OUI NON
- PMA : OUI NON

AUTRES :

☞ INVESTIGATIONS ET BILANS REALISES :

QUESTION	REPONSE	DATE DE L'EXAMEN	RESULTAT
ECHOGRAPHIE PELVIENNE /ENDO VAGINALE	OUI NON		
HYSTERO SLPINGO GRAPHIE	OUI NON		
HYSTEROSCOPIE	OUI NON		
BIOPSIE DE L'ENDOMETRE	OUI NON		
CEOLIOSCOPIE DIAG OU THERAPEUTIQUE	OUI NON		
DILATATION/CURETAGE	OUI NON		
TEST POST-COITAL	OUI NON		
DOSAGE HORMONAUX (OESTROG, PROGEST, PROLACTINE, FSH, LH)	OUI NON		
BILAN THYROIDIEN	OUI NON		
ANTICORPS ANTI-NUCLEAIRES	OUI NON		
CARYOTYPE	OUI NON		

☞ ATCDS MEDICAUX :

-
-
-

↵ **ATCDS CHIRURGICAUX :**

-
-
-
-

↵ **ATCDS FAMILIAUX :**

- CAS SIMILAIRE

AUTRES :

-
-

↵ **MODE DE VIE :**

- POIDS : •TAILLE :
- IMC :
- TABAC : CAFE : THE : EAU DE BOISSON : ROBINET : SOURCE : PUIITS :
- ALCOOL :
- RADIATION :
- ACTIVITE SPORTIVE : OUI NON
-
-
- ALIMENTATION ET AUTRES :

III. RETENTISSEMENT PSYCHOLOGIQUE :

- ANXIETE : OUI NON
- TROUBLE SOMEIL : OUI NON
- DEPRESSION: OUI NON
- CONFLIT CONJUGAL : OUI NON

AUTRES :

↪ AUTRE A AJOUTER:

[Redacted area containing multiple horizontal lines for text input]

I. IDENTIFICATION DE L'HOMME :

- AGE : [Redacted]
- NIVEAU SOCIO-ECONOMIQUE :
- LIEU RESIDENCE : URBAIN RURAL
- STATUT INTELECTUEL :
- PROFESSION :
- COUVERTURE SANITAIRE : [Redacted]

AUTRES : [Redacted box]

II. ANTECEDANTS :

☞ **VIE REPRODUCTIVES :**

• IST : OUI NON

• Ectopie testiculaire OUI NON

• Traumatisme testiculaire OUI NON

• Varicocèle OUI NON

AUTRES :

☞ **ATCDS MEDICAUX :**

-
-
-

☞ **ATCDS CHIRURGICAUX :**

-
-
-

☞ **ATCDS FAMILIAUX :**

• CAS SIMILAIRE

•

•

AUTRES :

☞ **MODE DE VIE :**

- POIDS : •TAILLE :
- IMC :
- TABAC : CAFE : THE : EAU DE BOISSON : ROBINET : SOURCE : PUIITS :
- ALCOOL :
- RADIATION :
- ACTIVITE SPORTIVE : OUI NON
-
-
- ALIMENTATION ET AUTRES :

III. RETENTISSEMENT PSYCHOLOGIQUE :

- ANXIETE : OUI NON
- TROUBLE SONEIL : OUI NON
- DEPRESSION: OUI NON
- CONFLIT CONJUGAL : OUI NON

AUTRES :

↳ AUTRE A AJOUTER:

