



**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

Université Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master 2

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Biologie Cellulaire Physiologie et Physio-pathologie

Intitulé :

Polymorphisme C677T du gène MTHFR et infertilité masculine

Présenté et soutenu par : BOULABIZA NAWEL

et

Le : 26 / 06 / 2014

GHODBANE ZAHRA

Jury d'évaluation :

Président du jury : L.ROUABAH

Prof Université Constantine1

Rapporteur :D.CHELLAT-REZGOUNE

MC.B Université Constantine1

Examineur : H.ZIADA-BOUCHAAR

MA.A Université Constantine1

ANNEE UNIVERSITAIRE 2013-2014

A decorative border of pearls and roses surrounds the text. The top border features a row of pearls. The left border is a vertical line of pearls. The bottom border is a horizontal line of pearls. The right border is a vertical line of pearls. There are also several roses scattered throughout the page, including a large white rose in the bottom right corner and a red rose in the top left corner.

Remerciements

Au tout puissant ALLAH : Merci de nous avoir tenues en bonne santé pour la réalisation de ce travail. Grace à vous nous avons eu la force et le courage d'entreprendre se travail.

Ce travail a été dirigé par Madame **REZGOUNE-CHELLAT Dj** que nous tenons à remercier très sincèrement pour son encadrement scientifique, sa disponibilité, pour les conseils qu'elle n'a pas cessé de nous prodiguer au cours de ce travail.

Ce travail de recherche a été réalisé au niveau su laboratoire central de l'Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine. Nous voudrions exprimer nos remerciements les plus sincères et les plus chaleureux au **Docteur MADOU** et **Docteur ALWAN** < médecin urologue> et tout le personnel du laboratoire qui ont contribué à son déroulement.

Nous tenons à remercier régalemment Monsieur **HAMDOUCHE ALI** qui sans son aide ce
Stage n'aurait pas au lieu

Nous tenons à remercier madame **ROUABEH. L** professeur à l'université Mentor de Constantine, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de soutenance de ce mémoire malgré ses lourdes responsabilités. Soyez assuré madame de notre sincère gratitude.

Nous exprimons notre profonde gratitude au Mme **BOUCHAAR-ZIADA H** d'avoir accepté de fait partie de ce jury et d'examiner ce travail.

Merci pour vous tous

A decorative border of pearls and roses surrounds the text. The top border consists of a row of pearls. The right border is a vertical line of pearls. The bottom border is a row of pearls. The left border is a vertical line of pearls. There are also several roses scattered throughout the page, including a large white rose in the bottom right corner and a red rose in the top left corner.

Dédicace

Aujourd'hui et après toutes ces années, j'ai l'honneur, mais surtout le plaisir de dédier ce travail de Master à toutes les personnes qui m'aiment et m'ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail.

A mon père **KAMEL**, qui a tout fait pour que rien ne me manque et pour que je sois la meilleure dans mes études. Merci mon père pour le courage que tu m'as donné durant toutes ces années, j'espère que tu serais fier de moi.

A ma mère **WARDA**, qui m'a aidé à aller toujours en avant et n'a pas ménagé ces forces pour me rendre la vie facile.

Mes chers parents, les mots me manquent pour tout ce que vous avez fait pour moi et mes frères. Mais je demande une seule chose au Miséricordieux, c'est de vous donner une longue vie pleine de santé pour en fin déguster le fruit de l'arbre que vous avez entretenu.

A mes frères : OUSSAMA, AYMEN, MOHAMED AMINE.

A mes grands – parents : - YAMOUNA et YOUCEF

-ALDJIA et RAMDAN

Que par les valeurs qu'ils m'ont inculquées et tout l'amour qu'ils m'ont apporté, m'ont construits les piliers.

A mes oncles et à mes tentes : RACHIDA, AMAR, SADJIA, WAHIBA, ALI, HASNA , FARHAT, MALIKA, SAMIA, NAIMA, BADRA, Et HOUCINE.

Qui m'ont toujours fait confiance

A Toute ma famille :

Qui m'a toujours soutenue.

A decorative border composed of a line of pearls on the right side and a line of roses on the left side, framing the text. The roses are in various stages of bloom, including a prominent white rose and a red rose bud. The pearls are arranged in a slightly irregular line, with some larger than others.

A mon encadreur **Mme REZGOUNE-CHALLAT DJ** qui je la dédie ce travail avant de remercier pour m'avoir guidé à le faire.

A mes amis **AFAF, HALA, ZAHRA, MERIEM, HADJER, SAFA** et à tous mes collègue de promotion 2013 / 2014 de Master BCPP.

Et à moi même

A detailed illustration of a white rose with several green leaves and water droplets on its petals and leaves. The rose is positioned in the bottom right corner of the page, partially overlapping the pearl border.

Dédicaces

Avant tout, louange à dieu qui nous offre toute la santé pour atteindre ce niveau de la réussite en construisant ce travail savant et modeste

*Mon cher papa, **Cherif**, qui a toujours cru en moi et a mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour que je réussisse dans mes études.*

*Ma chère mère, **Saliha**, que je ne cesse de remercier pour tout ce qu'elle m'a donné.*

Pour leur patience à toute épreuve, pour leur écoute, leurs conseils inestimables,

Pour les longues heures passées à mes côtés dans toutes mes épreuves,

Tout simplement pour leur amour

*A mon cher frère **Saddam hossin***

*A mes sœurs **Amira et Marwa***

À mes tantes et mes oncles.

*À toute la famille **Ghodbane et Darbel***

*A mon amie et binom **Nawel** pour son esprit d'équipe et à sa famille.*

*A toute mes amies **D.kawther K.Safia F. Merimem et B.Meriem** pour avoir partagé ensemble tant de bons moments.*

*Mes amies de promotion (**Master II bcpp 2014**)*

*À mon encadreur **Mme Rezgoune - Chellat Djalila***

A tous ceux que j'aime, tous ceux qui m'aiment et qui me respectent

Zahra

Liste des figures

	Titre	Page
Figure 1 :	L'appareil génital masculin	2
Figure 2:	Structure d'un spermatozoïde humain	4
Figure 3 :	Le tissu interstitiel	5
Figure 4 :	Les phases de la spermatogenèse	7
Figure 5 :	Répartition de la population selon le facteur tabagique	29
Figure 6 :	Répartition de la population selon la présence ou l'absence des antécédents familiaux	30
Figure 7 :	Répartition de la population malade selon la région	31
Figure 8 :	Les résultats du génotypage C667T de la MTHFR	32

Liste des tableaux

	Titre	Page
Tableau 1 :	Anomalies du spermogramme selon l’OMS	16
Tableau 2 :	Tableau de contingence	24
Tableau 3 :	Répartition des patients infertiles selon le type d’infertilité	26
Tableau 4 :	Répartition des patients infertiles en fonction de la durée d’infertilité.	26
Tableau 5 :	Répartition des patients en fonction des paramètres spermatiques.	27
Tableau 6 :	Répartition de la population malade selon la tranche d’âge.	28
Tableau 7 :	Rapport entre la tranche d’âge et les anomalies spermatiques.	28
Tableau 8 :	Répartition de la population malade selon le facteur tabagique.	29
Tableau 9 :	Rapport entre le tabac et les anomalies spermatiques.	30
Tableau 10 :	Répartition de la population malade selon la présence ou l’absence des antécédents familiaux.	30
Tableau 11 :	Répartition de la population malade selon la région.	31
Tableau 12 :	Fréquences génotypiques de la mutation C667T du gène MTHFR dans la population témoin.	32
Tableau 13 :	Fréquences génotypiques de la mutation C667T du gène MTHFR dans la population infertile.	32
Tableau 14 :	Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T de la MTHFR Chez la population témoin et chez les patients.	33

Liste des abréviations

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ARN :	Acide RiboNucléique
ABP :	Androgen Binding Protein
AS :	Asthénospermie
AZS :	Azoospermie
ANS :	Asthéno-nécrozoospermie
AGT :	Agglutinat
ATS :	AsthénoTératospermie
BGN :	Bacille Gram Négatif
BBP :	Bleu de BromoPhénol
BET :	Bromure d'ÉThidium
DO :	Densité Optique
EDTA :	Acide Éthylène Diamine TétrAcétique
EGF :	Epithelial Growth Factor
FSH :	Follicule Stimulating Hormone
GnRH:	Gonadotropin Releasing Hormone
IGF1:	Insulin Growth Factor 1
IL1:	InterLeukine- 1
IL6:	InterLeukine- 6
InL3:	Insulin- Like hormone 3
LGR8:	Récepteur couplé à une proteine G
LH:	Luteinizing Hormone
NGF:	Nerve Growth Factor
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
OAS:	OligoAsthenoSpermie
OS:	Oligospermie
PCR:	Polymerase Chain Reaction
SDS:	Sodium Dodécyle sulfate

SpB: Spermatogonie B
Sp I: Spermatocyte I
SP II : Spermatocyte II
SPZ: Spermatozoide
SRY: Sex determining Region Y chromosome
TBE: Tris Borate EDTA

Table des matières

	Page
Introduction.....	1

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Anatomie et physiologie de l'appareil génital mâle

1. Les testicules.....	2
1.1 Structure histologique de testicule.....	3
1.2 Physiologie du testicule.....	5
1.3 Interaction cellulaires au niveau du testicule.....	5
2. La spermatogenèse.....	6
2.1 Les phases de la spermatogenèse.....	6

Chapitre 2 : L'infertilité masculine

1. Définition.....	8
2. Epidémiologie.....	8
3. Classification étiologique de l'infertilité masculine.....	8
3.1 Classification selon le nombre de spermatozoïdes	8
3.2 Classification en fonction du lieu de l'atteinte et du mécanismephysiopathologique.....	9

Chapitre 3 : Aspects génétique de l'infertilité masculine

1. Anomalies chromosomiques et infertilité masculine.....	10
2. Mutations géniques et infertilité masculine.....	11
2.1 Les microdélétions du chromosome Y.....	11
2.2 Mutations du gène CFTR.....	11

2.3 Mutations des gènes INSL3-LGR8.....	11
2.4 POLG.....	12
2.5 AURKC et spermatozoïdes macrocéphales.....	12
3. Polymorphisme et infertilité masculine.....	12
3.1 DAZL et BOULE.....	13
3.2 FSHR.....	13
3.3 Polymorphisme du gène MTHFR.....	13

Chapitre 4 : Diagnostic et traitement de l'infertilité masculine

1. Diagnostic.....	15
1.1 L'interrogatoire.....	15
1.2 Examen clinique.....	15
1.3 Bilan para-clinique de première intention.....	15
1.4 Bilan endocrinien.....	17
1.5 Bilan d'anti-immunisation des spermatozoïdes.....	17
1.6 Biochimie du plasma séminal.....	17
1.7 Bilan génétique.....	17
1.8 Biopsie testiculaire.....	17
2. Traitement.....	18
2.1 Les médicaments.....	18
2.2 La chirurgie.....	18
2.3 Les techniques d'assistance médicale à la procréation.....	18

Partie pratique

1. Type d'étude.....	19
2. Patients.....	19
2.1 Les critères d'inclusion et d'exclusion des patients.....	19
2.2 Les critères d'inclusion et d'exclusion des témoins.....	19
3. Méthodes ou techniques employées.....	20

3.1 Spermoculture.....	20
3.2 Étude moléculaire.....	21
3.3 Analyse statistique.....	24

Résultats

1. Caractéristiques principales des patients.....	26
1.1 Répartition des patients infertiles selon le type d'infertilité	26
1.2 Répartition des patients infertiles en fonction de la durée d'infertilité.....	26
1.3 Répartition des patients en fonction des paramètres spermatiques.....	27
1.4 Répartition de la population malade selon la tranche d'âge....	28
1.5 Rapport entre la tranche d'âge et les anomalies spermatiques..	28
1.6 Répartition de la population malade selon le facteur tabagique	29
1.7 Rapport entre le tabac et les anomalies spermatiques.....	30
1.8 Répartition de la population selon les antécédents familiaux	30
1.9 Répartition de la population malade selon la région.....	31
2. Étude moléculaire.....	31
2.1 Génotypage du gène MTHFR.....	32
Discussion.....	35
Conclusion et perspectives.....	39
Références bibliographiques	
Résumés	
Annexes	

Le terme –infécondité- correspond à une situation dans laquelle un couple ne peut obtenir une grossesse spontanée en dépit d'une exposition au risque de grossesse pendant une période donnée. Une période de 12 mois est communément acceptée comme limite (Rowe *et al.*, 2000). Bien qu'arbitraire, cette période correspond au fait que la majorité (environ 85%) des couples qui ont obtenu une grossesse spontanée y sont parvenus en 12 mois.

Le terme – infécondité masculine primaire- est utilisé lorsqu'un homme n'a jamais pu féconder une femme.

Le bilan d'un couple infécond doit toujours comprendre l'exploration des deux partenaires. En général, un facteur masculin est détecté chez la moitié des couples pour lesquels des anomalies peuvent être démontrées. Chez la moitié de ceux-ci, un facteur féminin est également présent (Steinberger *et al.*, 1981; WHO, 1987).

90% des causes d'infertilité chez l'homme ne sont toujours pas élucidées, certaines seraient dues à des causes génétiques ou environnementales ou les deux, impliquant alors des gènes de susceptibilité à caractériser. Les anomalies génétiques peuvent être recherchées par trois approches:

- Cytogénétique : les anomalies chromosomiques représentent la cause la plus fréquente des infertilités ;
- L'analyse de gènes candidats utilise souvent les données obtenues dans les modèles animaux et principalement murins. Cette approche, très souvent utilisée dans la littérature, s'avère souvent longue, coûteuse et l'on découvre rarement une anomalie génique; c'est le cas par exemple des gènes de méiose;
- Troisièmement, des polymorphismes géniques peuvent être associés à une spermatogenèse défectueuse.

Notre travail vise à :

- Rechercher les principales causes des infertilités masculines à travers une étude bibliographique.
- Appliquer les techniques biologique et moléculaire (l'extraction d'ADN et PCR/digestion) pour mettre en évidence d'éventuelle association entre le polymorphisme C677T du gène *MTHFR* et l'infertilité masculine.

L'appareil génital masculin comprend :

- les deux testicules qui ont une fonction exocrine et endocrine.
- le tractus génital constitué par les voies spermatiques intra-titulaires (tubes droits et rete testis) et extra- testiculaires : système de canaux pairs (canaux ou cônes efférents, épидидyme, canal déférent et canal éjaculateur) assurant le transport des spermatozoïdes.
- les glandes annexes : les vésicules séminales, l'épididyme, la prostate, et les glandes de Cowper dont la fonction principale est sécréter le liquide séminal constituant le sperme avec les spermatozoïdes.
- le tractus uro-génital constitué par l'urètre (prostatique, périnéal et pénien) qui s'ouvre à l'extérieur par le méat urinaire (méat urétral). Ce dernier assure l'évacuation des urines lors de la miction et colle du sperme lors de l'éjaculation (Figure 1) (Vacheret, 1999).

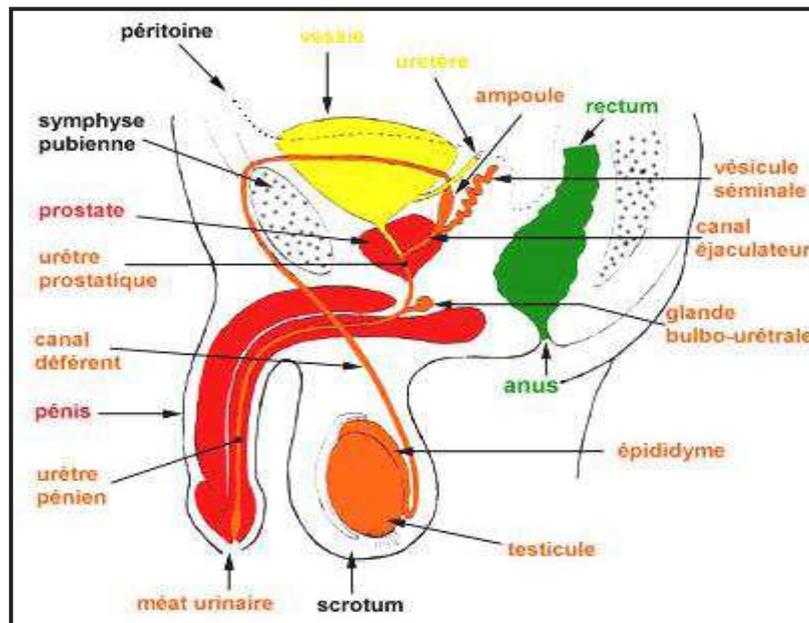


Figure 1 : L'appareil génital masculin [Vacheret, 1999].

1. Les testicules

Les testicules sont des organes pairs de forme ovale suspendus en dehors de la cavité pelvienne abdominale, dont la température se situe donc à 2-3 °C en dessous de la température corporelle centrale de 37°C.

Chaque testicule est entouré d'une capsule fibreuse blanchâtre dure, la *tunique albuginée*, qui contient des cellules musculaire lisse. Sur la surface dorsale, la tunique albuginée s'épaissit et

forme le médiastin testiculaire. Ici le sang et les vaisseaux lymphatiques, les nerfs et les canaux efférents drainant les spermatozoïdes à l'épididyme entrent ou sortent des gonades.

À partir de la tunique albuginée environ 250 travées fibreuses sont émises de façon centripète, subdivisant le parenchyme testiculaire en lobules. Dans chaque lobule, on observe un à quatre tubes séminifères très sinueux, qui produisent les spermatozoïdes les tubes séminifères se poursuivent à chaque extrémité avec d'autres tubes, les canaux efférents, qui transportent les spermatozoïdes du testicule au canal épидидymaire (Aumuller et Seitz, 1990).

1.1 Structure histologique du testicule

Les testicules ont la double fonction d'élaborer les cellules reproductrices masculines (spermatozoïdes) et de synthétiser les hormones sexuelles masculines.

1.1.1 Tubes séminifères

Les tubes séminifères ont un diamètre d'environ 180 μm et sont composés de la gaine pérítubulaire (lamina propria) et de l'épithélium séminifère. L'épithélium séminifère (80 μm) repose sur la membrane basale et est composé de cellules germinales à différents stades de développement et de cellules de Sertoli somatiques de soutien, qui présentent une ramification cytoplasmique très fournie et entourent les cellules germinales adjacentes qui s'organisent en plusieurs assises au niveau de l'épithélium séminifère. Les spermatogonies (**Sp**), les spermatocytes de premier ordre ou spermatocytes I (**SP I**), les spermatocytes de deuxième ordre ou spermatocytes II (**SP II**), les spermatides et les spermatozoïdes.

1.1.2 Les spermatozoïdes

D'environ 60 μm de longueur et présentant :

- Une tête aplatie et ovale (diamètre : 3 μm , longueur : 5 μm) comprend l'acrosome et le noyau extrêmement condensé.
- Un flagelle d'environ 55 μm de long, il possède l'axonème central (Figure 2).

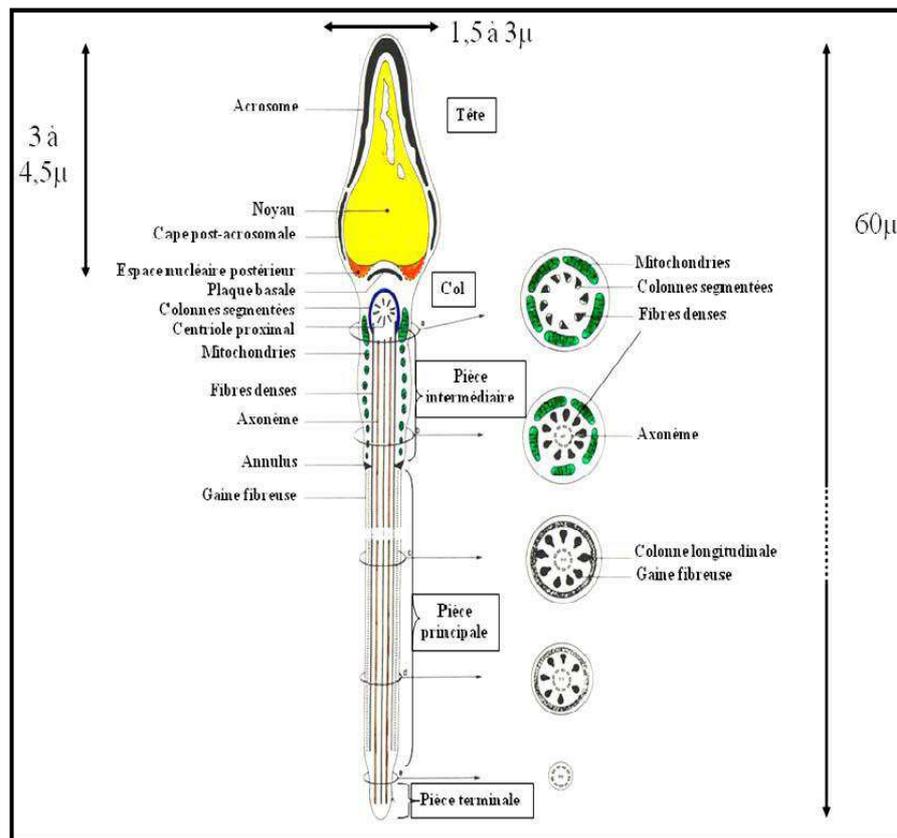


Figure 2 : Structure d'un spermatozoïde humain (Siffroi, 2001).

1.1.3 Tissu interstitiel

Les espaces compris entre les tubes séminifères sont occupés par du tissu conjonctif des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des nerfs. Le tissu conjonctif renferme des fibroblastes, des lymphocytes, des mastocytes, des macrophages impliqués à des titres divers dans les interactions cellulaires intragonadiques.

En outre, il contient un réseau de cellules fonctionnellement hétérogènes, connectées à la gaine péri-tubulaire, réparties dans la matrice extracellulaire et autour des vaisseaux et des cellules de Leydig (Figure 3). Ces cellules déterminent un compartimentage des espaces inter-tubulaires (Compartmentalizing cells, Co-cells) (Aumuller et Seitz, 1990).

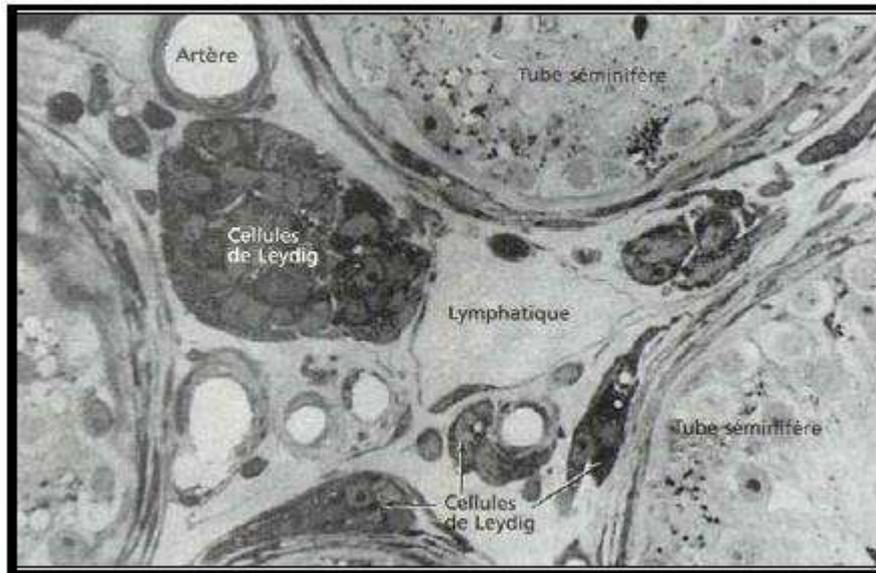


Figure 3 : Le tissu interstitiel (Siffroi, 2001) (grossissement X 40).

1.2 Physiologie du testicule

Les testicules ou glandes sexuelles présentent principalement deux fonctions :

- **Une fonction exocrine** : production de spermatozoïdes, assurée par les tubes séminifères.
- **Une fonction endocrine** : sécrétion d'androgènes (stéroïdes), en particulier la testostérone.

La régulation des fonctions testiculaires est assurée essentiellement par les hormones gonadotropes hypophysaires, FSH et LH, elles-mêmes contrôlées par l'hypothalamus grâce au GnRH (Rubenstein, 2005).

1.3 Interactions cellulaires au niveau du testicule

Les cellules de Sertoli libèrent des médiateurs responsables de la régulation des cellules germinales.

Les spermatides secrètent des facteurs de croissance EGF (Epithelial Growth Factor), NGF (Nerve Growth Factor) qui régulent le fonctionnement des cellules de Sertoli.

Les corps résiduels des spermatides matures assurent la stimulation des cellules de Sertoli qui libèrent des interleukines (IL-1, IL-6).

La production de testostérone par les cellules de Leydig est modulée par des facteurs libérés par les cellules de Sertoli (IGF 1 ou Insulin Growth Factor-1 stimule la stéroïdogénèse ; TGF b ou Tumor Growth Factor b).

L'élaboration de facteurs paracrines par les cellules de Leydig provoquent la sécrétion d'ABP et d'inhibine par les cellules de Sertoli (Siffroi, 2001).

2. La spermatogenèse

C'est l'ensemble des phénomènes de division et de différenciation cellulaire permettant la formation des cellules haploïdes (n) ou gamètes mâles (les spermatozoïdes) à partir des cellules diploïdes (2n), cellules germinales (les spermatogonies) ; elle a lieu dans les tubes séminifères des gonades mâles ou testicules. Débutant à la puberté, la spermatogenèse se poursuit quoique diminuée jusqu'à un âge avancé (Cabrol et Kalhe, 2004).

2.1 Les phases de la spermatogenèse

Dans les tubes séminifères adultes, les différentes couches de cellules germinales représentent les phases de la spermatogenèse qui s'effectue de façon centripète, depuis la spermatogonie située contre la membrane basale jusqu'au spermatozoïde libéré dans la lumière : on distingue quatre stades dans l'espèce humaine.

2.1.1 Phase de multiplication

Les spermatogonies se multiplient par mitoses somatiques normales ; la spermatogonie à chromatine sombre Ad (dark) se divise en deux cellules filles : une cellule Ad qui assure le renouvellement des cellules souches et une cellule Ap à chromatine pâle ; la cellule Ap est la cellule initiale de la spermatogenèse : elle se divise en 2 spermatogonies B à chromatine en, gros gains irréguliers et au nucléole bien visible.

2.1.2 Phase d'accroissement

Les spermatocytes I résultent de la division somatique des spermatogonies B; ils augmentent de volume puis ils sont le siège de la première division de la méiose (méiose I), appelée classiquement méiose réductionnelle (n chromosomes).

2.1.3 La méiose

La méiose est un phénomène complexe analysable sur 3 aspects différents mais étroitement liés :

- **Aspect cytologique** : les différentes phases de la méiose.
- **Aspect chromosomique** : appariement et ségrégation des chromosomes.
- **Aspect génétique** : les recombinaisons et le brassage des gènes (Machev et Fuhrmann, 2004) (Figure 04).

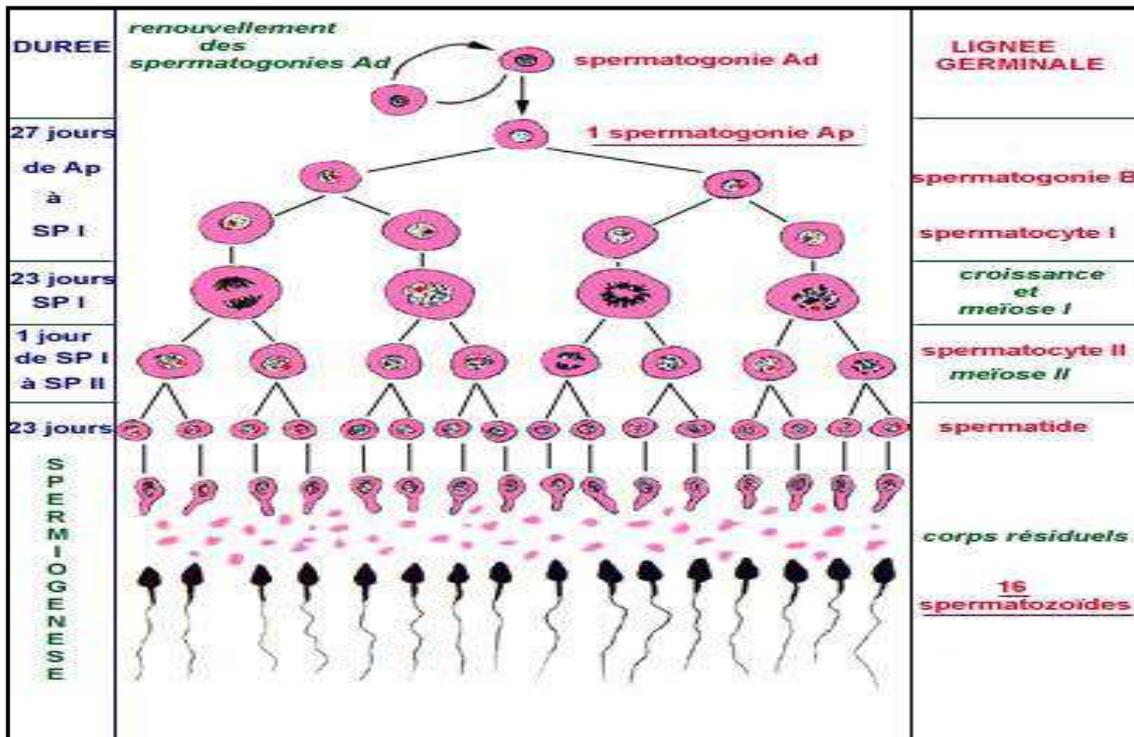


Figure 4: Les phases de la spermatogénèse (Vacheret, 1999).

2.1.4 La spermiogénèse :

Les spermatides subissent une différenciation radicale (il n’y a plus de division cellulaire) qui leur fait acquérir les caractéristiques cellulaires indispensables pour les rendre aptes à la fécondation. Elle s’effectue selon 4 étapes :

- La compaction de la chromatine nucléaire
- La réduction cytoplasmique
- La formation du l’acrosome
- La formation du flagelle (Siffroi, 2001).

1. Définition

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), l'infertilité est définie comme l'incapacité pour un couple de procréer après deux ans de rapports sexuels non protégés.

Les causes d'infertilité masculine sont nombreuses et multifactorielles. On distingue :

- des causes sécrétoires, les plus fréquentes, accompagnées d'un défaut de la spermatogenèse,
- et des causes excrétoires empêchant l'excrétion des spermatozoïdes.

2. Données épidémiologiques

Près de 15% des couples ont des difficultés à procréer, dont plus d'un tiers des cas un facteur masculin d'origine congénitale ou acquise est retrouvé associé ou non à une cause féminine, et dont 40% des cas, les causes sont multifactorielles et mixtes (Burkit *et al.*, 1993 ; Pentinnier *et al.*, 1998; Keskes *et al.*, 1998).

En Afrique, l'infertilité touche 25 à 40% de la population sud saharienne (Diadhiou et N'gom, 1988).

En France, la responsabilité de l'homme est de 20%, celle de la femme 33% et 39% pour les deux partenaires dans les stérilités (Auger et Kustmann, 1995).

3. Classification étiologique de l'infertilité masculine

3.1 Classification selon le nombre de spermatozoïdes

3.1.1 Azoospermie :

L'évaluation de la fertilité masculine débute par une analyse des constituants du sperme (spermogramme). Une anomalie est considérée comme effective lorsqu'elle est retrouvée à deux reprises sur des spermogrammes fait à distance l'un de l'autre. L'absence totale de spermatozoïdes sur deux spermogrammes successifs définit l'azoospermie. On distingue les azoospermies excrétoires et sécrétoires :

- Azoospermies sécrétoires

Elle est définie par l'absence de production de spermatozoïdes par les testicules. L'azoospermie est toujours sécrétoire lorsque le volume testiculaire est faible et la concentration plasmatique de FSH élevée et d'inhibine B abaissée. Cependant, des patients avec azoospermies sécrétoires peuvent présenter un volume testiculaire et des concentrations plasmatiques de FSH et d'inhibine B proches de la normale.

- **Azoospermie excrétoire**

Dans ce cas les spermatozoïdes sont correctement produits au niveau des testicules, mais il existe une obstruction des voies excrétrices siégeant entre les testicules et le carrefour uro-génital de tel sorte que les spermatozoïdes n'atteignent pas l'éjaculat.

3.1.2 L'oligozoospermie

L'oligozoospermie correspond à une faible quantité de spermatozoïdes dans le sperme (inférieure à 20 millions /ml ou inférieure à 40 millions par éjaculat et inférieure à 5 million par ml en ce qui concerne l'oligospermie sévère). Elle est rarement isolée et souvent associée avec une asthénospermie (anomalie de mobilité) et/ou une tétrazoospermie (formes anormales).

3.1.3 Polyzoospermie

Représente une numération de spermatozoïdes supérieure 250 millions/ml, le mécanisme de production est obscur (Schlosser *et al.*, 2007) .

3.2 Classification en fonction du lieu de l'atteinte et du mécanisme physiopathologique

3.2.1 Atteinte pré testiculaire

Elle peut être soit d'origine endocrine par insuffisance gonadotrope congénitale ou acquise, soit par trouble du coït (Rezgoune-Chellat, 2007).

3.2.1 Atteinte testiculaire

L'atteinte testiculaire est due à l'absence ou à l'arrêt de la spermatogenèse. Elle est fréquente (60%). La FSH peut être normale ou élevée. Elle peut être génétique ou non génétique (Rubentein *et al.*, 2005).

Les causes génétiques des infertilités masculines peuvent être classées en trois groupes :

- Les anomalies chromosomiques (numériques et structurales) ;
- Les mutations géniques ;
- Les polymorphismes géniques.

1. Anomalies chromosomiques et infertilité masculine :

Les études cytogénétiques réalisées dans les populations d'hommes infertiles présentant des altérations des paramètres spermatiques ont montré l'existence d'une relation entre anomalies chromosomiques constitutionnelles et infertilité masculine. Une anomalie chromosomique constitutionnelle peut altérer la fonction de reproduction de l'homme par une action spécifique sur la méiose ou sur la différenciation des cellules germinales. Cependant, son retentissement sur la fonction de reproduction présente une extrême variabilité dans son expression, de la subfertilité à la stérilité primaire. L'incidence des anomalies du caryotype chez les hommes infertiles oscillant entre 1,7 et 19,6 % est 10 à 15 fois plus élevée que celle observée dans une population de nouveau-nés (Van Assche *et al.*, 1996).

Le paramètre spermatique qui retient directement sur ces fréquences est la numération de spermatozoïdes avec un seuil à dix millions en dessous duquel l'augmentation s'accroît considérablement (Tuerlings *et al.*, 1998).

Les anomalies intéressant les chromosomes sexuels sont les plus fréquemment observées chez les hommes infertiles et l'incidence de ces anomalies sera d'autant plus élevée que la numération des spermatozoïdes sera faible. Le syndrome de Klinefelter (47, XXY) est la cause la plus fréquente d'hypogonadisme et d'infertilité chez l'homme. Sa prévalence est 50 fois plus élevée chez les patients infertiles azoospermiques (14 %) que dans la population générale (0,2 %) (Gekas *et al.*, 2001).

Puis viennent les sujets 47,XYY avec cependant une fréquence de cette anomalie dans la population d'hommes infertiles peu différente de celle de la population générale. La plupart des hommes 47,XYY ont une descendance à caryotype normal (Chandley *et al.*, 1997).

D'autres types de mosaïque gonosomique ainsi que des anomalies de structure des chromosomes sexuels telles que les inversions ou délétions du chromosome Y peuvent être observés (Dutrillaux, 1985).

L'anomalie chromosomique 46,XX est observée essentiellement chez les mâles azoospermiques, avec une fréquence de 0,9% (Mau-Holzmann, 2005). Le phénotype est semblable au syndrome de Klinefelter, mais avec une taille normale et une intelligence

intacte. Le gène SRY est présent dans la plupart des cas (SRY+) ; dans ces cas les mâles sont toujours stériles, et l'azoospermie résulte de l'atrophie testiculaire. L'autre catégorie de mâle XX sont les mâles (SRY-), ce qui suppose une mutation dans un gène autosomique ou lié à l'X impliqué dans la cascade du déterminisme sexuel qui devrait remplacer le gène SRY, permettant de déterminer des testicules en l'absence de SRY (Ferlin *et al.*, 2006).

2. Mutations géniques et infertilité masculine

2.1 Les microdélétions du chromosome Y

Les microdélétions du chromosome Y représentent une des causes génétiques les plus fréquentes de l'infertilité masculine. Cette cause concerne plus précisément les azoospermies ou oligospermies sévères. Ces microdélétions portent sur une partie du bras long du chromosome Y (Yq), appelée locus AZF (AZoospermia Factor).

Au sein du locus AZF, on distingue les sous régions AZFa, AZFb, AZFc sur lesquelles portent les microdélétions par ordre de fréquence croissant. Les délétions peuvent être situées sur une ou plusieurs régions (Benchimol, 2007).

2.2 Mutations du gène CFTR

Les nombreuses mutations du gène CFTR sont impliquées dans les différentes formes cliniques de mucoviscidose parmi lesquelles l'atrésie uni ou bilatéral des canaux déférents (ABCD) entraînant une oligozoospermie ou une azoospermie obstructive. Il semble que le gène CFTR est également impliqué dans différentes voies de signalisation du processus métabolique de la spermatogénèse et spermiogénèse. Il est exprimé dans les cellules de Sertoli et agit sur des facteurs de transcription comme la CRE-Binding Protein (CREB). La régulation de ces facteurs peut expliquer la relation entre de mutation de CFTR et certains types d'oligo ou d'azoospermie non obstructive (Xu *et al.*, 2011).

2.3 Mutations des gènes INSL3-LGR8

La cryptorchidie est un facteur favorisant l'infertilité car délétère pour les spermatogonies. La croissance du gubernaculum est sous le contrôle d'*InsL3* (*insulin-like hormone 3*). Cette hormone est produite par le testicule fœtal dans les cellules de Leydig. Une mutation dans le gène de cette hormone ou dans celui de son récepteur LGR8 (récepteur couplé à une protéine G) entraîne une cryptorchidie chez l'homme comme chez la souris. Par

contre, la plupart des cas de cryptorchidies ne sont pas dus à une mutation du gène *INSL3*, ce qui traduit l'hétérogénéité génétique de cette affection (Bogatcheva, 2007).

2.4 POLG

L'ADN polymérase gamma est impliquée dans les phénomènes de réplication et de réparation du génome mitochondrial. Chez l'homme, cette polymérase est composée d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité accessoire. Des mutations dans le gène de la sous-unité catalytique (POLG) sont à l'origine d'anomalies mitochondriales (Rovio, 2001 ; Krausz, 2004).

2.5 AURKC et spermatozoïdes macrocéphales

Le gène codant pour la kinase C Aurora (*AURKC*) est à ce jour le seul dont des mutations ont été identifiées chez les individus présentant une infertilité primaire caractérisée par une tératozoospermie avec 100 % de spermatozoïdes macrocéphales. Le gène *AURKC* code pour une sérine/ thréonine kinase appartenant à la famille Aurora, exprimée préférentiellement dans les testicules et impliquée dans la ségrégation des chromosomes et la division cellulaire lors de la méiose. La mutation initiale (c.144delC) dans le domaine kinase induit la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle : dans ces conditions il y a un arrêt de la ségrégation des chromosomes durant la méiose et de la cytokinèse. Il en résulte des spermatozoïdes tétraploïdes (Coutton *et al.*, 2012).

3. Polymorphisme génétique et infertilité masculine

Un gène est qualifié de polymorphe lorsque plusieurs allèles sont présents chez au moins 1% des individus. Un polymorphisme génétique se définit par la coexistence de plusieurs allèles (variation au niveau de la séquence nucléotidique) pour un gène donné dans une population. Ces variations peuvent concerner un seul nucléotide (SNP), intra génique ou non, ou une très large zone d'un chromosome incluant plusieurs gènes.

L'analyse des polymorphismes des gènes impliqués dans la spermatogenèse représente l'un des domaines les plus dynamiques de la recherche en génétique de l'infertilité masculine. Les polymorphismes ou variantes génétiques dans ces gènes sont considérés comme des facteurs de risque potentiels qui peuvent contribuer à la sévérité de l'insuffisance spermatique (Rezgoune-Chellat, 2013).

3.1 DAZL et BOULE

Le gène *BOULE* est le gène ancestral autosomique du gène *DAZ*, localisé sur le chromosome 2. *DAZL*, localisé sur le chromosome 3, est l'homologue autosomique du gène *DAZ* sur le chromosome Y. Il est exprimé dans les cellules germinales et code pour une protéine de liaison à l'ARN. Il n'y a pas de mutation décrite à l'heure actuelle mise à part la description de deux SNPs dans l'exon 2 (A260G) et l'exon 3 (A386G) (Bartoloni, 2004 ; Tschanter, 2004 ; Yang, 2005 ; Thangaraj, 2006 ; Teng, 2006).

3.2 FSHR

Chez l'homme, l'impact de tous ces variants est encore mal connu. Certains auteurs ne retrouvent pas de différence dans la distribution des polymorphismes de *FSHR* entre des patients normaux et infertiles (Simoni, 1999), tandis que d'autres rapportent une différence de fréquence allélique chez les patients azoospermiques en comparaison à des patients normospermiques (Ahda, 2005). D'autres études seront nécessaires pour toute conclusion définitive sur la responsabilité dans la survenue d'infertilité masculine.

3.3 Polymorphisme du gène MTHFR

L'enzyme 5-10 méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR) est une enzyme clé dans le métabolisme des folates. L'activité normale de cette enzyme permet de maintenir le pool de folates et de méthionine circulants et de prévenir de la sorte une éventuelle augmentation de la concentration en homocystéine. MTHFR joue également un rôle dans les processus de méthylation de l'ADN, de protéines, de neurotransmetteurs et de phospholipides. La méthylation de l'ADN joue un rôle primordial dans la régulation de l'expression des gènes et le maintien de la stabilité génomique. Elle est également impliquée dans la production de désoxythymidine monophosphate (dTMP) via la synthèse de purines et la thymidilate synthase. MTHFR est donc un élément essentiel à la provision de nucléotides nécessaires à la synthèse d'ADN et sa réparation. La voie enzymatique des folates est ainsi impliquée dans la stabilité de l'ADN et toute altération sur cette voie peut induire des cassures simple ou double brin dans l'ADN et/ou modifier le taux d'expression de certains gènes voire induire des anomalies de la ségrégation chromosomique (Rezgoune-Chellat, 2013).

Le gène MTHFR a été localisé sur le chromosome 1, en 1p36.3. Une mutation ponctuelle dans sa région codante, entraînant la substitution d'une cytosine par une thymidine au niveau de la 677^e paire de base dans le quatrième exon (C677T), aboutit à la substitution d'une alanine par une valine dans la séquence protéique. Cette mutation entraîne une

diminution de l'activité enzymatique de 30 % chez les hétérozygotes (CT) et 80 % chez les homozygotes (TT).

Plusieurs études ont été réalisées pour tenter de mettre en évidence le rôle éventuel sur la fertilité masculine de ce polymorphisme dans le gène MTHFR. Ainsi, il a été montré que 20 % des hommes consultant pour infertilité se révélaient être homozygotes pour le polymorphisme 677TT, soit le double de la fréquence dans la population contrôle étude (Bentivoglio *et al.*, 2007).

1. Diagnostic

1.1 L'interrogatoire

L'interrogatoire doit être méthodique, éventuellement structuré par l'utilisation d'un questionnaire-type, pour identifier tous les facteurs potentiels d'infertilité (Rowe, 2000). Il permet de préciser :

- les expositions professionnelles : chaleur, radiations
- les habitudes toxiques : tabac, éthyliste chronique, stupéfiants
- la nature d'infertilité : primaire ou secondaire (paternité antérieure)
- la durée d'infertilité et les résultats d'éventuels explorations et traitements entrepris
- l'âge de la partenaire
- le poids
- les antécédents familiaux d'infertilité pouvant orienter vers une cause génétique (Khallouk *et al.*, 2010)

1.2 Examen clinique

L'inspection recherche des signes de carence androgénique et de dysfonction endocrinienne (répartition gynoïde des graisses, raréfaction de la pilosité pubienne et thoracique, gynécomastie, galactorrhée), ainsi que les cicatrices chirurgicales abdominales et inguinales (Khallouk *et al.*, 2010).

1.3 Bilan para-clinique de première intention

1.3.1 Spermogramme et spermocytogramme

C'est l'étude des caractères macroscopique, microscopique (numérotation, aspect, mobilité et vitalité des spermatozoïdes, recherche des autres éléments cytologiques) et physico-chimique du sperme. C'est un examen indispensable de première indication dans la stérilité masculine. Il témoigne de la fécondance du sperme (Rives *et al.*, 2008)

Des valeurs de référence ont été définies par l'Organisation Mondiale de la santé (OMS) (Rives *et al.*, 2008) (Annexe 1).

Tableau 1 : Anomalies du spermogramme selon l'OMS (Rives *et al.*, 2008)

Hypospermie	volume éjaculatoire complet inférieur à 2 ml
Aspermie	Volume éjaculatoire nul
Hyperspermie	volume éjaculatoire supérieur à 6 ml
Oligozoospermie	Concentration en spermatozoïdes < 20 millions/ml
Modérée	de 5 à 20 millions/ml
Sévère	de 2 à 5 millions/ml
extrême	inférieure à 2 millions/ml
Polyzoospermie	Concentration de spermatozoïdes supérieure à 250 millions/ml
Azoospermie	absence de spermatozoïdes sur l'éjaculat « frais »
Cryptozoospermie	Quelques spermatozoïdes sur le culot de centrifugation examiné à fort grossissement ($\times 400$), mais pas sur l'examen de l' éjaculat « frais »
Asthénozoospermie	Diminution de mobilité de spermatozoïdes
Akinétozoospermie	Mobilité nulle de tous les spermatozoïdes du recueil
Tératozoospermie	Nombre de spermatozoïdes anormaux supérieur à 70 %
Nécrozoospermie	Baisse de vitalité des spermatozoïdes

1.3.2 Autres examens paracliniques

➤ Spermoculture :

Elle est réalisée pour la recherche d'une infection qui pourrait être à l'origine de l'altération du sperme. Elle est indiquée en cas de PH basique, d'hyperspermie, de leucospermie (>1millions de leucocytes par ml), d'asthénotératospermie et d'antécédents infectieux (Schlosser *et al.*, 2006)

1.4 Bilan endocrinien :

Il est réalisé en cas d'azoospermie, d'oligoasthénospermie sévère (<5 millions/ml), de troubles de l'érection avec baisse de libido ou de signe clinique d'endocrinopathie. L'évaluation minimale comporte un dosage sérique de la FSH et de la testostérone plasmatique (Sigman et al., 2007).

1.5 Bilan d'auto-immunisation des spermatozoïdes :

L'auto-immunisation est recherchée en cas d'autoagglutinats spontanés du sperme, d'asthénospermie, de nécrozoospermie, de stérilité inexplicée, de test postcoïtal négatif ou de mauvaise qualité, d'antécédents de chirurgie urogénitale, d'obstruction congénitale ou acquise, d'infection ou inflammation génitale, d'échec de fécondation in vitro (Baethelemy, 2003 ; khallouk *et al.*, 2010).

1.6 Biochimie du plasma séminal

Il est surtout intéressant de réaliser ces dosages biochimiques en cas d'azoospermie d'origine obstructive pour préciser le niveau de l'obstruction sur la voie séminale.

1.7 Bilan génétique

Les anomalies génétiques peuvent être la cause d'infertilité masculine en affectant la spermatogenèse ou le transport du sperme.

- **Anomalies du caryotype :** Le caryotype doit être proposé dans les situations suivantes :
 - une azoospermie non obstructive
 - une oligospermie sévère (<1 millions/ml) sur plusieurs prélèvements
 - une oligospermie avec antécédent familiaux de trouble de la reproduction.
- **Recherche de mutations de gènes de la spermatogenèse (microdélétions du chromosome Y).**

1.8 Biopsie testiculaire

Elle est indiquée en cas d'azoospermie à volume testiculaire normale ou peu diminué. Elle permet également d'évaluer la capital et la qualité des spermatozoïdes en vue d'une micro-injection (ICSI) (Khallouk *et al.*, 2010).

2. Traitement

2.1 Les médicaments

Moins de 5% des hommes infertiles présente des troubles hormonaux pouvant être traités par thérapie hormonale. Lorsque l'infertilité masculine est due à une infection, un traitement antibiotique adapté est entrepris (Samaké, 2007).

2.2 La chirurgie

Le traitement chirurgical de l'infertilité masculine vise à éliminer les obstacles anatomiques empêchant la production et la maturation des spermatozoïdes (dans les testicules et dans l'épididyme) ou l'éjaculation (Samaké, 2007).

2.3 Les techniques d'assistance médicale à la procréation :

Malgré leur succès, les technique d'AMP restent un traitement symptomatique de l'infertilité lorsque la cause n'a pas été identifiée et/ou corrigée. Parmi les techniques d'assistance médicale à la procréation, on peut citer :

- L'insémination artificielle utérine.
- La fécondation in vitro (FIV).
- Les techniques de micro fécondation ou micro-injection ou ICSI (Insémination intra cytoplasmique du sperme) (Khallouk *et al* ., 2011)

1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude cas-témoins qui s'est déroulée à Constantine, au sein du laboratoire central et du service d'ana-pathologie de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine et au niveau du laboratoire privé « El Farabi » du 13 Avril au 13 Mai 2014, 44 prélèvements ont été réalisées (12 patients et 32 témoins).

L'étude moléculaire (extraction d'ADN et PCR/digestion) a été effectuée au niveau du laboratoire de biologie et génétique moléculaire CHU, Université Constantine 3.

2. Patients

Il s'agit de 12 patients adressés par leurs médecins gynécologue ou urologue dans le cadre d'investigation d'une infertilité du couple soit pour un bilan lors d'une atteinte de l'appareil génital masculin, soit pour un examen de contrôle. Nous avons recherché les caractéristiques suivantes chez chaque patient :

- Le type d'infertilité et sa durée.
- Les anomalies du spermogramme.
- L'âge.
- Les habitudes toxiques (tabac).
- Les antécédents familiaux.
- La profession.
- La région.

Le questionnaire qui a été utilisé est placé dans l'annexe 1.

.1 Les critères d'inclusion et d'exclusion des patients

- Sont inclus dans cette étude tous les patients ayant un spermogramme anormal (azoospermie, oligospermie, asthénospermie ou une tératospermie).
- Sont exclu de l'étude les patients avec un dossier incomplet et tous les patients ayant un spermogramme normal.

.2 Les critères d'inclusion et d'exclusion des témoins

- Sont inclus dans cette étude tous les sujets avec une fertilité prouvée par la naissance au moins d'un enfant ou présentant un spermogramme normal.
- Sont exclus de l'étude les sujets transfusés ou présentant une autre pathologie.

3. Méthodes ou techniques employées

3.1 Spermoculture

La spermoculture est la recherche d'une infection (essentiellement bactérienne) dans le sperme. Elle consiste en l'examen direct au microscope d'un échantillon de sperme suivi de sa mise en culture sur milieu approprié pour la croissance des bactéries.

3.1.1 Préparation des milieux de culture

- Le milieu de culture Hectoen
- Le milieu de culture Chapman
- Le milieu de culture chocolat <sang cuit>
- Le milieu de culture sang frais
- Le milieu de culture MH <Muller Hintou>
- Milieu de culture MH au sang
- Milieu de culture de gélose nutritive

3.1.2 Examen direct

➤ État frais

On dépose une goutte du sperme entre lame et lamelle. Puis on fait une observation au microscope optique avec grossissement (G4x10) pour la recherche des : Leucocytes, hématies, cellules épithéliales, levures, Trichomonas ou autres cellules.

➤ Après coloration

La coloration se fait avec le bleu de méthylène. On ajoute quelque goutte de l'huile à immersion et on observe au microscope optique pour la recherche des : Polynucléaires, lymphocytes, hématies, cellules épithéliales, flore bactérienne : Bacilles ou des cocci.

3.1.3 La culture

- On prépare 4 milieux de cultures : chocolat < sang cuit> , sang frais, Hectoen ; sélectif pour BGN (Bacill Gram négatif) et Chapman ; sélectif pour Staphylocoque.
- On dépose une goutte du sperme dans les quatres milieux de cultures et on fait l'ensemencement.

➤ Les boîtes sont mis dans l'étuve à 37 °c pendant 24 heures ; chocolat et sang frais dans l'étuve à CO₂, chapman et Hectoen dans l'étuve normal. Lorsqu'on trouve un germe pathogène on fait l'identification :

- Selon Gram < négatif ou positif >
- Selon l'antibiogramme < gram résistant ou sensible >
- Selon la galerie

3.2 Étude moléculaire

3.2.1 Prélèvement sanguin

Le prélèvement sanguin recommandé pour l'extraction de l'ADN est recueilli dans des conditions stériles, dans un tube vacutainer EDTA (acide Ethylène Diamine TétrAcétique), en quantité de 4 à 8 ml, au niveau des services concernés (Hôpital Militaire Universitaire Régional de Constantine, laboratoire privé El Farabi).

3.2.2 Extraction d'ADN

La réalisation d'une étude moléculaire nécessite la disposition d'échantillons d'acides nucléiques, les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN.

Il existe plusieurs techniques utilisées pour extraire l'ADN : au chlorure de guanidine, au phénol-chloroforme. Celle employée au niveau du laboratoire de biologie génétique moléculaire du CHU de Constantine est une méthode utilisant un solvant inorganique, NaCl.

➤ Principe

La totalité du sang prélevé est mise dans un tube contenant la solution de lyse pour séparer les leucocytes du sang total par lyse hypotonique des globules rouges ; et ils seront ensuite traités par :

- Un détergent SDS (Sodium dodécyle sulfate) qui possède une action lytique sur les membranes cellulaires, dénature les protéines par destruction de leur structure tertiaire et inhibe l'action des nucléases.
- La protéine K qui dénature et dégrade les protéines.
- L'ADN nucléaire est libérée dans le lysat et les protéines qui lui associées sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl. La pelote d'ADN est formée dans le surnagent par précipitation avec l'éthanol pur.
- L'ADN est ensuite solubilisé en phase aqueuse (eau stérile bidistillée). L'échantillon est dilué au 1 /100 dans l'eau bidistillée : 10 µl de l'ADN solubilisé dans 990 µl d'eau distillée.

- La pureté ainsi que la concentration de l'ADN sont déterminées par spectrophotomètre. L'ADN absorbe à 260 nm (longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques) alors que les protéines qui représentent les témoins de contamination absorbent à 280 nm (longueurs d'onde d'absorption des protéines). En effectuant le rapport de DO 260 nm/DO 280 nm, la pureté de l'ADN est déterminée en vérifiant la contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN. On considère que :

- L'ADN est suffisamment pur lorsque : le rapport $R = DO_{260}/DO_{280}$ et compris entre 1,6 et 2 ($1,6 < R < 2$).
- L'ADN est contaminé par les protéines si : $DO_{260}/DO_{280} < 1,6$.
- L'ADN est contaminé par les ARN si : $DO_{260}/DO_{280} > 2$.

La pureté de l'ADN est nécessaire pour une bonne amplification génique. Les ADN purs sont conservés à +4° jusqu'à utilisation.

➤ Détermination de la concentration de l'ADN

La valeur de DO à 260nm nous permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que :

- 1 unité de DO à 260nm = 50 µg/ml d'ADN double brin.
- L'ADN obtenu est dilué à 1/100, la quantité obtenue est multipliée par 100.

Exemple :

Pour un ADN solubilisé dans 1000 µl d'eau bi-distillée ayant une DO à 260nm=0,128

$$1 \text{ unité de DO}_{260\text{nm}} \quad \Longrightarrow \quad 50 \text{ µg/ml d'AND}$$

$$0,128 \text{ de DO } 260\text{nm} \quad \Longrightarrow \quad X$$

$$X = 0,128 * 50 = 6.4 \text{ microgramme/ml}$$

3.2.3 PCR du gène MTHFR

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une technique d'amplification d'ADN in vitro. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes :

- Une **dénaturation** de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent,
- Puis **hybridation** des amorces aux extrémités 3' de la séquence recherchée,
- Puis une **élongation** grâce à l'action d'une **ADN polymérase**.

Ces trois étapes sont répétées un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (la **durée d'un cycle** est de l'ordre de la **minute**).

➤ Préparation du milieu réactionnel de PCR

Le milieu réactionnel de PCR doit comprendre tous les constituants nécessaires à la réalisation d'une PCR. Pour préparer le milieu réactionnel ou le mix, il faut multiplier la quantité de chaque composant par le nombre de tubes voulu plus deux, ces derniers représentent le tube témoin <blanc> dans lequel on met uniquement le mix sans ADN, et le témoin positif respectivement.

Dans des tubes nunc de 0.2 ml on met 49 μ l du mix et 1 μ l d'ADN soluble, le mélange ainsi obtenu est mis dans un thermocycleur qui est programmé au préalable pour la réalisation de la PCR. Les conditions de PCR sont les suivantes :

- Un premier cycle de 5 minutes et à une température de 94°C pour la dénaturation préalable (séparation des brins)
- 35 cycles chacun comprend trois étapes :
 - 30 secondes à une température de 94°C pour la dénaturation.
 - 30 secondes à une température de 61°C pour l'hybridation.
 - 30 secondes à une température de 72 °C pour l'élongation.
- Élongation finale à 72° pendant 10 min.

➤ Contrôles des produits de PCR

Un gel d'agarose à 2% sera préparé comme suit :

- Mélanger 100 ml de tampon TBE 1X avec 2 g d'agarose.
- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes pendant 4 à 6 minutes jusqu'à ce qu'il devient homogène.
- Ajouter 10 μ l de BET (bromure d'éthidium), un agent intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice et qui rendra les ADN fluorescents par exposition aux UV.
- Le gel est ensuite coulé lentement pour ne pas faire des bulles dans le moule de la cuve horizontale.
- Laisser refroidir, enlever le peigne. Le gel sera prêt ainsi pour le dépôt des échantillons.
- Dans chaque puits du gel, on dépose : 10 μ l du produit de PCR mélangé avec 3 μ l du BBP (Bleu de Bromophénol) qui permet de suivre le front de migration. Dans le dernier puits on met 10 μ l de marqueur de taille. Les dépôts se font du côté anode (-).
- Le système est soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 45min. Cette analyse a pour but de confirmer l'amplification de notre ADN et de contrôler la taille du

fragment amplifié et aussi de vérifier une éventuelle contamination de l'ADN au cours de la PCR grâce au puits contenant le blanc (Témoin négatif : T).

- Après la migration, le gel est soumis au rayon UV. Les molécules de bromure d'éthidium intercalées entre les bases nucléiques émettent une lumière visible et photographiable et permettent de visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes ayant toutes la même taille.

Un tableau contenant tout le matériel et les réactifs utilisés est placé dans l'annexe 2.

3.3 Analyse statistique

3.3.1 Calcul de l'odds ratio

En général, dans les analyses statistiques, et en particulier quand il s'agit d'une étude cas témoins, il est nécessaire de calculer l'Odds ratio et pour cela, nous avons établi un tableau de contingence :

Il est présenté sous forme de tableau croisé 2×2. Le statut malade/non malade des sujets est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne.

Tableau 2: Tableau de contingence

	Patients	Témoins	
Exposés	a	b	a+b
Non exposés	c	d	c+d
	a+c	b+d	total

L'odds ratio se calcule en appliquant la formule suivante :

$$\text{OR} = a*d / b*c$$

L'Odds ratio représente une mesure d'association épidémiologique entre un facteur et une maladie, en particulier lorsque la maladie est rare parmi la population.

3.3.2 Les intervalles de confiance

Les intervalles de confiance ont été calculés par la méthode de Cornfield. L'approche estimative de l'analyse statistique vise à quantifier l'effet étudié et le degré de certitude de cette estimation grâce à un intervalle de confiance, qui identifie généralement une fourchette de valeurs situées de part et d'autre de l'estimation et l'on peut être sûr à 95% de trouver la valeur réelle.

3.3.3 Choix de la "p value "

Le seuil critique a priori est de 0,05 (risque α). Si la valeur de p calculée à posteriori est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative.

Ces calculs statistiques ont été effectués par le logiciel Epi info version 6.0.

1. Caractéristiques principales des patients

Dans cette étude cas-témoins, un total de 44 individus a été inclus. Parmi ces derniers nous avons recensé 12 patients et 32 témoins soient des proportions respectives de 27,27 % et 72,72% de la population étudiée.

1.1 Répartition des patients infertiles selon le type d'infertilité

Tableau 3 : Répartition des patients selon le type d'infertilité

Patients	Effectif	%
Infertilité primaire	12	100
Infertilité secondaire	0	0
Total	12	100

Les résultats obtenus montrent que l'infertilité primaire est prédominante (100%) par rapport à l'infertilité secondaire.

1.2 Répartition des patients infertiles en fonction de la durée d'infertilité

Tableau 4 : Répartition des patients infertiles en fonction de la durée d'infertilité

	La durée d'infertilité	%
2 – 4 ans	4	33,33
5 – 7 ans	4	33,33
8 – 10 ans	3	25
10 – 12 ans	1	8,33
Total	12	100

Le tableau 4 montre que 33,33% des patients avaient une durée d'infertilité inférieure ou égale à 7 ans. La majorité des patients qui ont une infertilité primaire consultent leur médecin après une période d'infertilité de 2 à 4 ans.

La durée moyenne de l'infertilité était de 6,16 ans avec des extrêmes de 2 à 12 ans.

1.3 Répartition des patients en fonction des paramètres spermatiques

Tableau 5 : Répartition des patients en fonction des paramètres spermatiques.

Anomalie spermatique	Effectif	%
Azoospermie (AZS)	3	25
Asthénospermie (AS)	2	16,66
Asthéno-tératospermie (ATS)	3	25
Agglutinat (AGT)	1	8,33
Oligo-asthénospermie (OAS)	2	16,66
Asthéno-nécrozoospermie (ANS)	1	8,33
Total	12	100

Nous avons effectué une répartition de l'ensemble des sujets suivant les résultats du spermogramme que présente chacun d'eux. Le tableau 5 montre que l'azoospermie et l'asthenotératospermie sont les anomalies les plus fréquentes avec une prévalence de 25%. L'asthénospermie et l'oligoasthénospermie occupent la deuxième place avec une fréquence de 16,66%. L'asthénonécrozoospermie et la présence d'agglutinats occupent les dernières positions avec la même fréquence de 8,33%.

1.4 Répartition de la population malade selon la tranche d'âge

Tableau 6: Répartition de la population malade selon la tranche d'âge

Tranche d'âge	Effectif	%
[25 – 30]	2	16,66
[31 – 35]	3	25
[36 – 40]	4	33,33
[41 – 45]	2	16,66
[46 – 50]	0	0
[51 – 55]	1	8,33
Total	12	100

Concernant l'âge des patients, nous avons remarqué que les patients âgés de 36 à 41 ans représentent la plus grande fréquence de 33,33%. L'âge moyen de nos patients est de 33,58 ans avec des extrêmes allant de 25 à 55 ans.

1.5 Rapport entre la tranche d'âge et les anomalies spermatiques

Tableau 7 : Rapport entre la tranche d'âge et les anomalies spermatiques

Anomalies spermatique	[25,30]	[31,35]	[36,40]	[41,45]	[46,50]	[51,55]	Total
Azoospermie (AZS)	0	0	1	1	0	1	3
Asthenospermie (AS)	1	0	1	0	0	0	2
Asthenotératospermie (ATS)	1	1	1	0	0	0	3
Agglutinats (AGT)	0	0	0	1	0	0	1
Oligoasthenospermie (OAS)	0	2	0	0	0	0	2
Asthenonécrozoospermie (ANS)	1	0	0	0	0	0	1
Total	3	3	3	2	0	1	12

Le tableau 7 montre que les anomalies spermatiques sont retrouvées particulièrement dans la tranche d'âge de 25 à 30 ans et de 36 à 40 ans. L'azoospermie et l'asthenotératospermie sont les anomalies les plus fréquentes alors que la majorité des patients qui ont l'asthenotératospermie sont âgés de 30 à 40 ans.

1.6 Répartition de la population malade selon le facteur tabagique

Tableau8 :Répartition de la population malade selon le facteur tabagique

Tabac	Effectif	%
Fumeurs	5	41,66
Non-fumeurs	7	58,33
Total	12	100

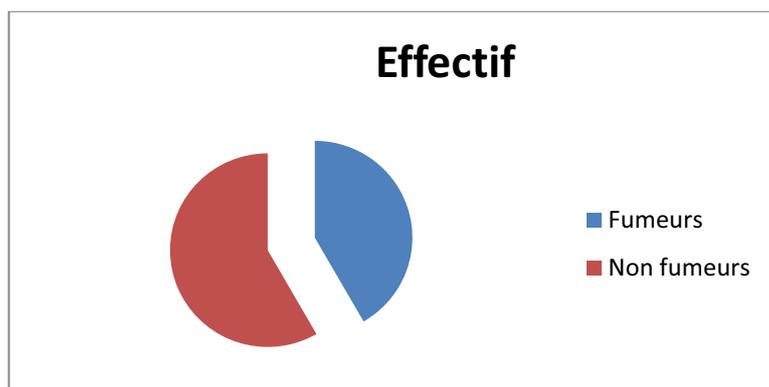


Figure5: Répartition de la population malade selon le facteur tabagique.

Le résultat obtenu montre que sur 12 patient étudiés 5 sont des fumeurs (41,66%) et 7 (58,33%) sont des non- fumeurs. Malgré que le pourcentage des non-fumeurs est légèrement supérieur à celui des fumeurs cela n'exclut pas le fait que le tabagisme a des effets délétères sur la fertilité masculine. Il existe un passage de la barrière hémato-testiculaire de certaines substances contenues dans la fumée de cigarette. La présence de tels composés dans le liquide séminal des fumeurs entraîne une altération des paramètres spermiologiques classiques et de la qualité nucléaire des spermatozoïdes.

1.7 Rapport entre le tabac et les anomalies spermatiques

Tableau9 :La distribution des patients en fonction du statut tabagique et des anomalies spermatiques

Tabac	AGT	ATS	AS	AZS	AGT	OAS	ANS	Total	%
Fumeurs	1	0	4	0	0	0	0	5	41,66
Non-fumeurs	0	1	0	2	1	2	1	7	58,33
Total	1	1	3	3	1	2	1	12	100

Le tableau9 montre que l’asthénospermie est beaucoup retrouvée chez les fumeurs par rapport aux sujets non-fumeurs. Cette différence n’a pas été retrouvée pour les autres types d’anomalies, ce qui confirme que le tabagisme représente un facteur de risque pour les infertilités masculines.

1.8 Répartition de la population selon les antécédents familiaux

Tableau 10 : Répartition de la population selon la présence ou l’absence des antécédents familiaux.

	Effectif	%
Avec antécédents familiaux	2	16,66
Sans antécédents familiaux	10	83,33
Total	12	100

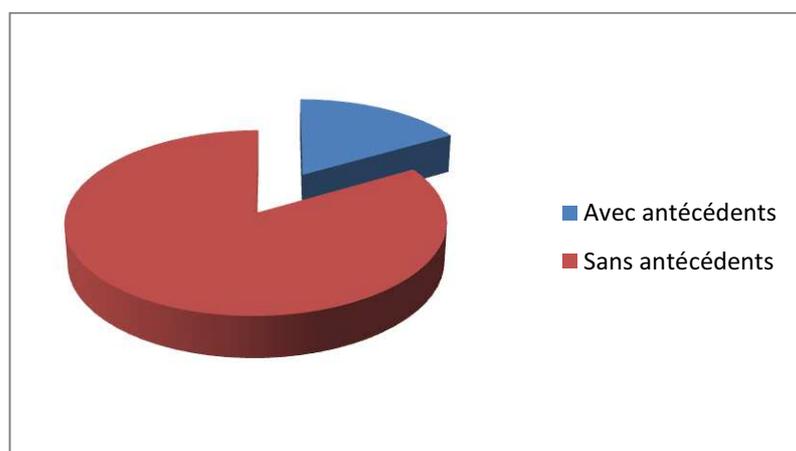


Figure6 : Répartition de la population malade selon les antécédents familiaux.

Sur les 12 patients étudiés, nous avons trouvé que 2 sujets avaient des antécédents familiaux soit une fréquence de 16,66%, alors que la majorité 83,33% n'avaient pas d'antécédents familiaux.

1.9 Répartition de la population malade selon la région

Tableau 11 : Répartition de la population malade selon la région

La région	Effectif	%
Constantine	3	25
Mila	6	50
Bordj-Bouariridj	1	8
Alger	1	8
Khenchela	1	8
Total	12	100

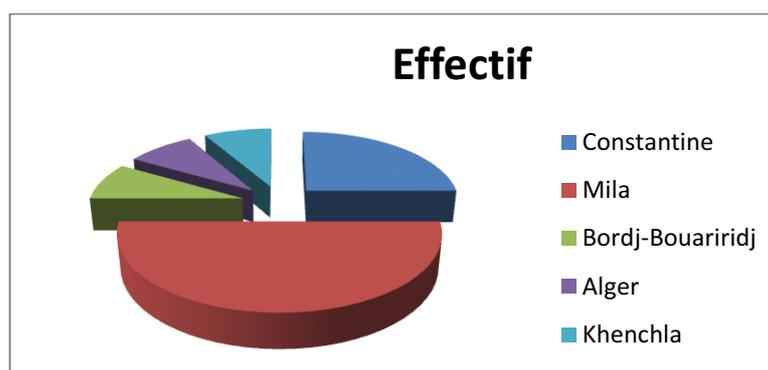


Figure7 : Répartition de la population selon la région

Le tableau 11 et la figure7 montrent que parmi 12 patients 6 sont de la wilaya de Constantine soit 25%, 50% de Mila, et seulement 8% de Bordj-Bouariridj, Alger et Khenchla. Cela est due au fait que la moitié des patients ont été prélevés au niveau du laboratoire privé « El Farabi » qui se situe dans la wilaya de Mila.

2. Étude moléculaire :

L'étude moléculaire a été réalisée sur 12 patients et 32 témoins. Notre objectif consiste à chercher d'éventuelle association entre le polymorphisme C677T du gène MTHFR et l'infertilité masculine.

2.1 Génotypage du gène MTHFR :

Les résultats du génotypage de la MTHFR permettent de mettre en évidence les génotypes suivants :

- Homozygote CC (val/val)
- Hétérozygote CT (ala/ala)
- Homozygote TT (val/ala).

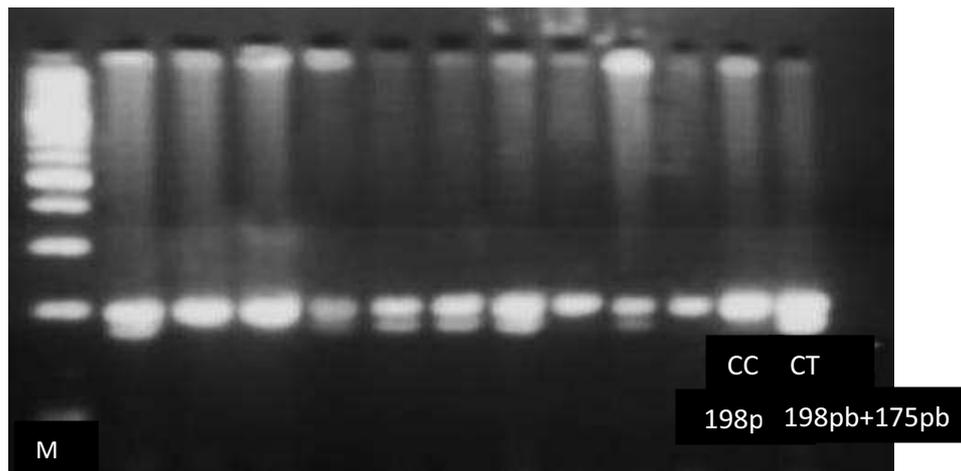


Figure 8: Les résultats du génotypage C677Tde la MTHFR.M, marqueur de taille d'ADN ;CC, type sauvage homozygote ; CT, hétérozygote ;TT, mutant homozygote.

2.1.1 Les sujet témoins

Tableau 12: Fréquences génotypiques du polymorphisme C677T du gène de la *MTHFR* dans la population témoin.

Génotypes	Effectifs	Fréquences (%)
CC	18	56,25
CT	9	28,12
TT	5	15,62
Total	32	100

La distribution du polymorphisme C677T du gène MTHFR dans notre population témoin est très hétérogène avec une fréquence génotypique de 15,62% pour le génotype TT, de 56,25% pour le génotype CC, et de 28,12% pour le génotype CT.

2.1.2 Les patients

Tableau 13: Fréquences génotypiques du polymorphisme C677T du gène de la *MTHFR* dans la population infertile.

Génotypes	Effectifs	Fréquences (%)
CC	7	58,34
CT	5	41,67
TT	0	00
Total	12	100

Dans notre population malade, nous n'avons pas trouvé le génotype homozygote TT chez tous les patients génotypés. Une fréquence de 41,66% a été observée pour le génotype CT, et une fréquence de 58,34 % pour le génotype CC. Cela peut être expliqué par le nombre très réduit des patients étudiés.

Tableau 14 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T de la *MTHFR* chez la population témoin et chez les patients.

Génotype	Patients		Témoins		OR	P value
	n	%	n	%		
C/C	7	58,34	18	56,25	-	-
C/T	5	41,67	9	28,12	1,43 (0,28-7,19)	0,86
T/T	0	0	5	15,62	0,0 (0,0-4,08)	0,44
Allèle C	19	79,17	45	70,32	-	-
Allèle T	5	20,83	19	29,68	0,62 (0,17-2,13)	0,57
Total	12	100	32	100	-	-

Le tableau ci-dessus montre la comparaison des fréquences génotypiques entre les témoins et les patients infertiles.

Les fréquences génotypiques CC, CT, TT ne diffèrent pas considérablement entre les patients et les témoins, et on remarque que ces fréquences se répartissent selon un ordre décroissant respectivement.

On observe aussi qu'il n'y a pas de différences remarquables entre les deux allèles C (type sauvage) et T (type muté) des patients et des témoins.

Ainsi après calcul des Odds ratio et des P value, on remarque que selon les valeurs de ces deux paramètres (OR et $P > 0,05$), il n'existe pas d'association significative entre le polymorphisme C677T et l'infertilité masculine que ce soit pour le génotype **CT** (**OR = 1,43** et **P = 0,86**) ou pour le génotype **TT** (**OR = 0,00** et **P = 0,44**).

Au cours des dernières décennies, il y a une préoccupation croissante au sujet de la santé reproductive masculine. Une baisse temporelle de la qualité du sperme a été signalée dans plusieurs études (Carlsen *et al.*, 1992 ; Auger *et al.*, 1995 ; Swan *et al.*, 2000), tandis que d'autres études n'ont constaté aucun changement au cours du temps pour ces mêmes entités pathologiques (Bujan *et al.*, 1977 ; Olsen *et al.*, 1995)

Plusieurs études nationales préliminaires ont été réalisées à cet effet pour confirmer ou infirmer cette baisse alarmante de la fertilité masculine. La plupart de ces études ont été réalisées au niveau de structures hospitalières étatiques (Centres Hospitalo-Universitaires) ou au sein de laboratoires privés de Constantine. En revanche, notre étude a été effectuée au niveau de l'hôpital militaire régional de Constantine et un laboratoire privé de Mila.

Il s'agit d'une étude cas-témoins qui s'est déroulée sur une période de 1 mois et qui a concerné 12 patients répondants à nos critères d'inclusion.

Au cours de cette étude plusieurs paramètres ont été étudiés :

- La fréquence de l'infertilité masculine primaire est de 100%. Dans la région d'Annaba une étude a été menée et l'auteur a signalé un taux élevé des cas consultants pour une infertilité primaire par rapport au cas consultants pour une infertilité secondaire soit des proportions respectives de 75,84% et 24,16%. D'autres études indiquent des taux d'infertilité primaire de 73,48% et d'infertilité secondaire de 26,52% (Daroui, 2001). Dans une autre étude menée par Nazzal (2002), des taux respectifs de 87% et 13% ont été signalés. Par ailleurs, en Europe et plus particulièrement, en France, les travaux de Thonneau et al. (1991) révèlent des taux d'infertilité primaire et secondaire de 67% et 33% respectivement.

- Dans notre population d'étude la durée moyenne d'infertilité était de 6,16 ans avec des extrêmes allant de 2 à 12 ans. 33,33% des patients avaient une durée d'infertilité inférieure ou égale à 7 ans et 8,33% une infertilité supérieure à 10 ans. Une étude menée par Rowe (1996), compare les valeurs retrouvées en Afrique et dans les pays développés qui sont respectivement de 30 et 46% pour une durée d'infertilité inférieure à 2 ans et de 16% et 7% pour une durée d'infertilité supérieure à 8 ans. En plus les couples ayant une durée d'infertilité inférieure ou égale à 3 ans ont plus de chance d'avoir une grossesse naturelle que les autres. Les patients avec une infertilité primaire ont une durée d'infertilité de 2 à 4 ans tandis que ceux avec une infertilité secondaire ont une durée de 5 à 7 ans.

- L'analyse cytologique a révélé une prédominance d'azoospermie et d'asthénotératospermie (ATS) avec une fréquence de 25% suivie par l'asthénospermie (AS) et l'oligoasthénospermie (OAS) avec une fréquence de 16,66%, l'asthénonécrozoospermie

(ANS) et l'agglutinats avec 8,33%. Nos résultats rejoignent ceux observés par Zeghib (2009) où l'anomalie majeure était l'asthénotéatospermie (ATS) avec une fréquence de 33,33%. Nos résultats semblent relativement différents à ceux observé par Benmechirah et Chaker (2012) où l'anomalie majeure était l'oligoasthénospermie (OAS) avec 33,33% de fréquence suivie par l'asthénospermie (AS) avec 26,80% de fréquence.

- L'âge moyen de nos patients est de 33,58 ans avec des extrêmes allant de 25 à 55 ans. La tranche d'âge de 36 à 40 ans était la plus représentée avec une fréquence de 33,33%, ces résultats sont relativement différents à ceux de Zeghib (2009) qui avait trouvé que la tranche d'âge la plus affectée est celle de 31 à 35 ans avec un taux de 31,67% et à ceux de Penlape (2005) qui avait aussi trouvé que la tranche d'âge de 31 à 36 ans était la plus représenté (50%) de l'échantillon étudié. Une étude menée par Mputu (1986) en république démocratique du Congo avait trouvé un âge moyen de 32,42 ans.

En effet deux travaux réalisés au Sénégal par Auroux (1983) et par Adjakou (2002) ont rapporté respectivement un âge moyen de 34 ans et 39,3 ans. Tandis que les travaux de Nseke au Cameroun rapportent à un âge moyen de 32,3 ans.

Cela peut s'expliquer par le fait qu'avant ses 30 ou 36 ans l'homme est moins préoccupé par le désir d'avoir des enfants mais entre 31 et 40 ans le désir de paternité est intense, poussant les mariés qui n'arrivent pas à procréer à confier plus rapidement à un médecin. La tranche d'âge de plus de 55 ans ne représente que 8,33% des patients de notre série. Ce faible taux serait en rapport avec un désir d'avoir des enfants limités à cet âge où le désespoir et le fatalisme prennent le devant.

- Les anomalies spermatiques sont retrouvées particulièrement dans la tranche d'âge de 25 à 30 et de 36 à 40 ans, pour les patients âgés de 25 à 40 ans, l'azoospermie et l'asthénotéatospermie sont les anomalies les plus fréquents alors que la majorité des patients qui ont une asthénotéatospermie sont âgés de 30 à 40 ans.

- Le pourcentage des fumeurs pour les hommes infertiles était de 41,66% et n'était donc pas différent de la population autrichienne masculine, pour laquelle un pourcentage de 44,2% des fumeurs a été rapporté (Langgassner, 1999). L'asthénospermie est beaucoup plus retrouvée chez les fumeurs par rapport aux sujets non-fumeurs

La cigarette peut être associée à la sous-fertilité chez les hommes et peut entraîner la diminution de la concentration du sperme, la faiblesse de la motilité des spermatozoïdes, ainsi que la réduction du pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux respectivement. (Lewin *et al.*, 1991 ; Sofikitis *et al.*, 1995 ; Zinaman *et al.*, 2000). Dix-neuf études évaluant l'influence du tabagisme sur les paramètres du sperme chez les hommes

infertiles ont été publiés à ce jour (Vigne, 1996 ; Zinaman *et al.*, 2000). Dans une méta-analyse (vigne, 1996) dont 27 études sur l'association entre le tabagisme et la qualité du sperme, une réduction moyenne de la concentration du sperme de 13%, une réduction moyenne de la motilité de spermatozoïdes de 10%, et une réduction moyenne de spermatozoïdes morphologiquement normaux de 3% a été signalée chez les fumeurs. D'autre part, Belcheva *et al.* (2004) n'ont rapporté aucune différence significative dans les paramètres du sperme standards entre les fumeurs en bonne santé et les non-fumeurs.

- La fréquence des patients qui n'ont pas d'antécédents familiaux est supérieure (83,33%) à celle (16,66%) des patients avec des antécédents familiaux.

- Parmi 12 patients, 6 sont de la wilaya de Mila soit un pourcentage de 50%, 25 % de Constantine et seulement 8% d'Alger, Bordj-Bouariridj et Khenchla. Cette diversité de lieu d'origine peut être expliquée par le fait que l'Hôpital militaire reçoit plusieurs patients de différentes wilayas ainsi que les prélèvements ont été réalisés parallèlement au niveau d'un laboratoire privé de Mila.

- Dans notre étude nous avons réalisé le génotypage du gène de la MTHFR afin de rechercher une éventuelle association entre le polymorphisme C677T de ce gène et l'infertilité masculine.

Dans notre population malades, nous n'avons pas trouvé le génotype homozygote TT chez tous les patients génotypés, une fréquence de 41,66% a été observé pour le génotype CT, et une fréquence de 58,33% pour le génotype CC. En revanche, chez les témoins nous avons observé une fréquence de 56,25% pour le génotype CC, une fréquence de 28,12% pour le génotype CT et une fréquence de 15,62 % pour le génotype TT.

Ces résultats sont différents à ceux de Park *et al.* (2005) qui avait trouvé pour ses patients une fréquence de 12,88% pour le génotype TT ; de 50,50% pour le génotype CT et de 36,62% pour le génotype CC, et pour sa population témoin a trouvé une fréquence de 16,89% pour le génotype TT, 54,96% pour le génotype CT et de 28,15 pour le génotype CC.

Selon la valeur P calculée, on peut dire qu'il n'existe pas d'association significative entre le polymorphisme C677T et l'infertilité masculine que ce soit pour le génotype **CT (OR =1,43 et P= 0,86)** ou pour le génotype **TT (OR= 0,00 et P= 0,44)**. Nos résultats sont en accord avec l'étude publiée précédemment par Stuppia *et al.* (2003) qui n'ont pas trouvé d'association entre l'allèle C677T et l'infertilité chez la population italienne (composée de 93 patients et 105 contrôles fertiles). Chellat *et al.* (2012) ont également montré que la MTHFR C677T n'est pas un facteur de risque pour l'infertilité masculine. Ebisch *et al.* (2003), suggèrent que le

polymorphisme C677T n'est pas un facteur de risque pour l'infertilité masculine bien qu'ils indiquent que les folates jouent un rôle important dans la production de sperme.

Contrairement à ces résultats Gava *et al.* (2012) suggèrent que la MTHFR pourrait être un facteur génétique important prédisposant à l'infertilité idiopathique chez les hommes brésiliens. Ainsi, Nair *et al.* (2011) ont trouvé que la fréquence de l'allèle mutant T et le génotype (TT + CT) ($p= 0,0187$) est significativement plus élevée chez les personnes infertiles en comparaison avec des témoins fertiles. Han-chul *et al* (2006) par l'analyse d'un grand nombre de sujets et une sélection plus spécifique de patients, ont démontré la première preuve génétique que les génotypes C677T MTHFR, A2756G MS et A66G MTRR étaient indépendamment associés à l'infertilité masculine dans la population coréenne.

L'absence d'association retrouvée dans notre étude peut être expliquée par le nombre insuffisant de patients étudiés (12) d'une part et d'autre part par le fait que les facteurs environnementaux et d'autres gènes contribuent également au bon fonctionnement de la spermatogenèse.

La diminution de la fertilité chez l'homme est accentuée dans les dernières années. Cela est dû en générale au changement des conditions de vie actuelle par rapport à ce qui a été dans le passé, à savoir : le changement du régime alimentaire et l'augmentation accrue de la fréquence des maladies sexuellement transmissibles. Tous ces changements peuvent avoir un impact grave sur la fertilité de l'homme.

Notre étude a concerné 12 patients infertiles recrutés au niveau du laboratoire central de l'Hôpital Militaire Régional de Constantine et du laboratoire privé El-Farabi de la wilaya de Mila, pendant une période d'un mois (Avril 2014 à Mai 2014). Cette étude nous a permis de tirer des conclusions sur l'association du polymorphisme C677T du gène MTHFR et l'infertilité masculine.

Notre échantillon était constitué totalement des hommes avec infertilité primaire (100%). La durée moyenne de l'infertilité était de 6,16 % ans avec des extrêmes allant de 2 à 12 ans. La plupart de nos patients n'ont pas d'antécédents familiaux. Les résultats du spermogramme dans notre série ont révélé beaucoup d'anomalies spermatiques dont l'azoospermie et l'asthénotérospermie sont les anomalies les plus fréquentes.

Selon les résultats de l'étude moléculaire qui a concerné le polymorphisme C677T du gène MTHFR, nous pouvons dire que ce polymorphisme n'est pas un facteur de risque pour notre population. Cependant, notre échantillon n'était pas représentatif de la population algérienne.

Il serait par conséquent intéressant de prévoir dans nos perspectives :

- De réaliser une enquête plus approfondie, basée sur un échantillon plus grand ;
- Rechercher les microdélétions du chromosome Y et les mutations des autres gènes impliqués dans la spermatogenèse.

Références bibliographiques

Adjakou A, Allyx J (2000). Infertilité masculine. Profil clinique dans une consultation d'andrologie à Dakar Th. Méd. Dakar, n° 52.

Angélique L (2007). Entre attente des couples et recommandations: quelle implication possible pour le médecin généraliste dans la prise en charge de l'infertilité ? Enquête d'opinions auprès de 96 couples infertiles. Thèse méd ; Nantes, N°63.

Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New Engl J Med* ; 332 :281-5.

Auger J, Kustmann J M, Czyglik F, Jouannet P (1995). Decline in semen quality among fertile man in Paris during the past years. *New Engl. J.Med*; 332 : 281-5.

Aumuller G, Seitz J (1990) protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* 121;127-231

Auroux M (1983). The sperm and its abnormalities. *Rev Prat.* 11;33(57):3119-31.

Bartoloni L, Cazzadore C, Ferlin A, Garolla A, Foresta C (2004). Lack o the T54A polymorphism of the DAZL gene in infertile Italian patients. *Mol Hum Reprod*; 10 : 613-5.

Batch JA, Patterson MN, Hughes IA (1992). Androgen insensitivity syndrome. *Reproductive Medicine Review*, 1, 375-383.

Benchimol (2007). Microdélétions du chromosome Y et stérilité : infertilité masculine (en ligne).

Benmechirah et Chaker (2012). L'infertilité masculine : étude statistique et moléculaire. Master 2 BCPP Université Constantine 1.

Benninghoff A, Drenchhan D (2002) Anatomie. Ma KrosKOpische anatomie, histologie, Emrylogie, Zellbiologie, Bd.1. Urban and Fischer, Munich

Blecheva A, Ivanova-Klcheva M, Tzvetkova P (2004). Effets de la cigarette sur le sperme intégrité de la membrane plasmatique et l'ADN : la fragmentation int *Androl J*2004 ; 27 :296.

Bogatcheva NV, Ferlin A, Feng S, et al. T222P mutation of the insulin-like 3 hormone receptor LGR8 is associated with testicular maldescent and hinders receptor expression on the cell surface membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007 ; 292 : E138-E144.

Bujan L, Mansat A, P ontonnier F, Mieusset R (1992). Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and. Br Med J 1996; 312 :471.

Cabrol C, Kalhe W, Leonhardt H, Platzer W (2004). Anatomie 2 viscères.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Br Med J; 305 :609-13

Chandley AC (1998). Genetic contribution to male infertility. Hum Reprod 13: 76-83

Chellat DJ, Rezgoune ML, Hamane D et al (2012). Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase *C677T* Gene Polymorphisms in Algerian Infertile Men with Azoospermia or Severe Oligozoospermia. Genetic testing and molecular biomarkers 16 (8).

Daroui MH (2001). Exploration cytologique et biochimique dans l'hypo infertilité masculine. Thèse de magistère en biochimie appliquée. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université d'Annaba.91pp. Algérie.

Diadhiou F, N'gom A, Diallo Fb, Cisse Ci, Gueye M, Maiga A, Correa P (1988). Profil épidémiologique et coût de la stérilité conjugale au CHU d Dakar 1987. Actes du 1er congrès de la société de gynécologie et d'obstétrique du Bénin et du Togo. Cotonou.

Dutrillaux B, Muleris M, Prieur M (1985). Exact localization of several fragile sites remains uncertain. The example of fra(10) sensitive to folate]. Ann Genet; 28(3):161-3. French.

Ebisch IM, van Heerde WL, Thomas CM, van der Put N, Wong WY, Steegers-Theunissen RP (2003). C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism interferes with the effects of folic acid and zinc sulfate on sperm concentration. Fertil Steril; 80: 1190-1194.

Ferlin A, Arredi B, Foresta C (2006). Genetic causes of male infertility. Reprod Toxicol.; 22: 133-141.

Gava MM, de Oliveira, Chagas E, Bianco B, Christofolini DM, Pompeo AC, Glina S, Barbosa CP (2010). Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Are Related to Male Infertility in Brazilian Men. Genet Test Mol Biomarkers; 15: 153-157.

Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carré-Pigeon F, Wasels R, Benzacken B; Association des Cytogeneticiens de Langue

Francaise (2001). Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod* ;16(1):82-90.

Han-Chul L, Yu-Mi J, Sook Hwan L, Kwang Yul C, Seung-Hun S, Nam Keun K, Kyo Won L, Suman L (2006). Association study of four polymorphisms in three folate-related enzyme genes with non-obstructive male infertility. *Human Reproduction*; 21: 3162-3170.

Jauzein F, Magre S (2001). La différenciation sexuelle morphologique [en ligne] INRA

Krausz C, Rajpert-De Meyts E, Frydelund-Larsen L, Quintana- Murci L, McElreavey K, Skakkebaek NE (2001). Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab*; 86 : 2638-42.

Langgassner F (1999). Interrelations de la cigarette, les varicocèles testiculaires, et les indices du liquide séminal. *Fertil. Steril.*, 47. 481-486.

Lewin A, Gonen O, Orvieto R et Schenker JG (1991). Effet du tabagisme sur la concentration , la motilité et de test du hamster zona-libre sur le sperme humain. *Arch.*

Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC, Mc Elreavey K, Bashamboo A. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med.* 2009; 360: 1200-1210.

Machev N, Fuhrmann G, Viville S (2004). Ontogenèse des cellules germinales primordiales. *Medecine/sciences*; 20: 1091-5.

Mau-Holzmann UA (2005). Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res*; 111: 317-336.

Mputu L, Wolomby M, Mahekele K (1986). Contribution of male component to the infertility of couples in Kinshasa. *J gynecol Obstebiol reprod*; 15(1):51-8.

Nair RR, Khanna A, Singh K (2012). MTHFR C677T polymorphism and recurrent early pregnancy loss risk in north Indian population. *Reprod Sci.* Feb;19(2):210-5.

Nazzal N (2002). Approche biologique et thérapeutique d'infertilité masculine. Thèse de doctorat en médecine. Faculté de médecine. Université d'Annaba. Algérie 71pp.

Olsen GW, Bodner KM, Ramlow JM, Ross CE (1995). Lipshultz LI. Have sperm counts been reduced 50 percent in 50years A statistical model revisited. *Fertil Steril*; 63:887-93

Park JH, Lee HC, Jeong YM, Chung TG, Kim HJ, et al (2005). MTHFR 677C>T polymorphism associates with unexplained infertile male factors. *J Assist Reprod Genet* 22: 361–368.

Penlap CK (2005). Analyses cytospermiologiques au service de cytogénétique et de biologie de la reproduction de L'INRSP. A propos de 860 cas. Thèse Méd.Bamako.N°125.

Rezgoune-Chellat Djalila (2007). Analyse cytogénétique des anomalies chromosomique des hommes infertile. Faculté des Science Nature et de la Vie. Département des Science de la Nature et de la Vie. Université Mentouri Constantine.

Rovio AT, Marchington DR, Donat S, et al (2001). Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility. *Nat Genet*; 29 : 261-2.

Rowe et al., (1996)

Rowe PJ, Comhair FH, Hargreave TB, Mellows H J (1996). Exploration et diagnostic standardisés de l'infertilité masculine du couple. Manuel de l'O.M.S; Edition Inserm.

Rubenstein J, Brannigan RE. Infertility, Male. **2005**; section 1

Rubentein J, Brannigan R (2005). Infertilité , Male; section 1-11

Rucker GB, Mielnik A, King P, Golstein M., Schlegel P.N (1998). Preoperative screening for genetic abnormalities in men with nonobstructive azoospermia before testicular sperm extraction. *J.Urol*, 106:6, 2068-71.

Schlosser J, Nakib I, Carré-pigeon F et Staerman F (2007) infertilité masculine : définition et physiopathologie. *Annales d'urologie* (41) : 127-133

Sepaniak S, Forges T, Fontaine B, Gerard H, Foliguet B, Guillet-May F et al (2004). Impact négatif du tabac sur la fertilité masculine : des spermatozoïdes à la descendance. *Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction*.

Siffroi JP. L'appareil génital masculin [en ligne] (2001) Service d'Histologie, Biologie de la Reproduction et Cytogénétique Hôpital Teno. p 1-45.

Siffroi JP. L'appareil génital masculin [en ligne] (2001). Service d'Histologie, Biologie de la Reproduction et Cytogénétique Hôpital Tenon. p 1-45.

Siffroi JP. La spermatogenèse [en ligne] (2001). Service d'Histologie. Biologie de la Reproduction et Cytogénétique Hôpital Tenon. p 1-57.

Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavis, P, Sikka S et Hellstrom W (1995). Effets du tabagisme sur la fonction testiculaire, la qualité du sperme et de la capacité du sperme fécondant. *J. Urol.*, 154 ,1030-1034. *Urol.*, 154 1030-1034.

Steinberger (1981). Current status of studies concerned with evaluation of toxic effects of chemicals on the testes. *Environ Health Perspect*;38:29-33.

Stuppia L, Gatta V, Scarciolla O, Colosimo A, Guanciali-Franchi P, Calabrese G, Palka G (2003). The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and male infertility in Italy. *Endocrinol Invest*; 26: 620-622.

Swan SH, Elkin EP, Fenster L (2000). The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934n of de *Environ Health Perspect*; 108:961.

Teng YN, Lin YM, Sun HF, Hsu PY, Chung CL, Kuo PL (2006). Association of DAZL haplotypes with spermatogenic failure in infertile men. *Fertil Steril*; 86: 129-35

Thonneau P et Bujan L (1991). Épidémiologie de l'infertilité masculine. *Rev. prat.* (43)8 : 936-940.

Tuerlings JH, Mol B, Kremer JA, Looman M, Meuleman EJ, te Meerman GJ, Buys CH, Merkus HM, Scheffer H (1989). Mutation frequency of cystic fibrosis transmembrane regulator is not increased in oligozoospermic male candidates for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.*;69(5):899-903.

Vacheret N. Histologie fonctionnelle des organes [en ligne]. Faculté de Médecine. Laennec. - Université Claude Bernard - Lyon 1 France. Octobre **1999.**)

Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I (1996). Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod*;11 Suppl 4:1-24; discussion 25-6.

Vigne MF (1996). Le tabagisme et la reproduction masculine : un examen *int.Jandrol.*,19.232.337.

World Health Organization. Cambridge University Press (1999).

XU WM chen J, Diao Ry et al (2011). Defective CFTR-dependant CREB activation results in impaired spermatogenesis and azoospermia. PLoS one.

Zeghib F (2009). Les infertilités masculines : étude cytologique et biochimique. Magistère en Biologie cellulaire et moléculaire. Université Mentouri de Constantine.

Zinaman, MJ, Brown CC, Selvan SG et Clegg ED (2000). La qualité du sperme et la fertilité humaine : une étude prospective avec des couples saïs J. Androl., 21.145-153.

Annexe 1 : Fiche de renseignements sur les infertilités masculines.

1. État civil du patient

Nom et prénom	Adresse/Tel :
Age :	Origine :
Poids :	Profession

2. Renseignements cliniques

- type d'infertilité (I aire ou II aire) :
- l'âge de l'infertilité :
- autres maladies :
- mode de vie (sport ,tabagisme ,alcool)
-
- antécédents familiaux : si oui 1^{er} degré ,2éme degré

3. Biologie

1- Les hormones

FSH = , LH= ,testostérone=

D'autres hormones :

2- Spermogramme

	Volume (ml)	NB de spz (millions /ml)	Vitalité (%)	mobilité	Morphologie (%)	autres	classification
1° spermogramme 2° SPG							

Consentement du patient

-Je déclare avoir été informé(e) , oralement et par écrit ,des objectifs et du déroulement de l'étude sur les infertilités masculines.

Lieu , date	Signature du patient
-------------	----------------------

Annexe 2 : Matériels et Réactifs pour extraction d'ADN et PCR.

Matériel	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"> - Diffuseur de glace. - Étuve. - Centrifugeuse. - Roue. - Réfrigérateur. - Spectrophotomètre. - Thermocycleur. - Four à micro-onde. - Balance électrique. - Générateur accordé à une cuve de migration. - Chambre à UV accordé à in micro-ordinateur. - Chambre de PCR à UV. - Vortex. - Peigne. - Pipette à 1000µl. - Pipette à 500µl. - Pipette à 200µl. - Pipette à 20µl. - Tubes Vacutainer EDTA. - Tubes coniques de 50ml et 15ml. - Tubes Eppendorf 1,5ml. - Barrettes de 8 tubes nunc de 0,2 ml. 	<ul style="list-style-type: none"> -Tris EDTA 20 :5 -Tampon de lyse (NaCl 400mM, ESTA 2mM, Tris 10mM, Ph8,8). -SDS à 10%(Sodium dodécyle sulfate). -Protéinase K à 10mg/ml. -NaCl 4M. -Eau bidistillée. - Éthanol à 70%. - Éthanol pur -dNTP (di nucléotide triphosphate). -Un couple d'amorces spécifiques de la séquence d'ADN du gène MTHFR(1µl pour chaque amorce). -Tampon. -MgCl₂ à 50Mm. -La Taq polymérase. -Eau bidistillée. -Huile de paraffine. - Gel d'agarose à 2% : <ul style="list-style-type: none"> -100 ml de tompon TBE 1 X(Tris Bromate EDTA). -BBP (Bleu de Bromophénol) - Marqueur de taille.

Résumé

Objectif : l'infertilité masculine est l'impossibilité pour un homme de procréer du fait d'un défaut de son sperme. Les connaissances anatomophysiologique sont indispensables pour la compréhension des différents mécanismes de l'infertilité masculine. L'objectif de notre travail est d'établir une étude statistique sur un ensemble de patients infertiles à travers une enquête prospective d'une part et d'autre part de rechercher d'éventuelle association entre le polymorphisme C677T du gène MTHFR et l'infertilité masculine.

Patients et méthodes : notre étude est de type cas-témoins, elle a été menée sur 12 patient infertiles (l'âge moyen : 33,58 ans) et 32 hommes fertiles. L'ADN génomique a été extrait à partir des leucocytes. La recherche du polymorphisme C677T du gène MTHFR pour les patients et les témoins a été réalisée en utilisant la méthode PCR/digestion.

Résultats : nos résultats montrent que l'azoospermie et l'astheno-téatospermie sont les anomalies spermatiques les plus fréquentes. Selon les résultats de l'étude moléculaire, il n'existe pas d'association entre le polymorphisme C677T et l'infertilité masculine.

Conclusion : nos données indiquent que la fréquence des anomalies spermatiques retrouvées dans notre échantillon est comparable à celle de la littérature. L'absence d'association entre le polymorphisme étudié et l'infertilité masculine peut être expliquée par la taille faible de l'échantillon. Mais ces résultats ne peuvent pas être généralisables à l'ensemble de notre population. Une grande étude éventuelle est nécessaire pour vérifier nos résultats.

Mots clés : infertilité masculine, polymorphisme, gène MTHFR.

Abstract

Objective: male infertility is the inability of a man to procreate due to a defect in his sperm. The anatomophysiological knowledge is essential for understanding the different mechanisms of male infertility. The objective of our work is to establish a statistical study of a set of infertile patients through a prospective study on the one hand, and secondly to look for possible association between C677T polymorphism of MTHFR gene and male infertility.

Patients and Methods: Our study is a case-control study, it was conducted on 12 infertile patients (mean age: 33.58 years) and 32 fertile men. Genomic DNA was extracted from leukocytes. The search for the C677T polymorphism of MTHFR gene in patients and controls was performed using PCR / digestion methods.

Results: Our results show that azoospermia and asthenoteratospermia are the most frequent sperm abnormalities. According to the results of the molecular study, no association between the C677T polymorphism and male infertility.

Conclusion: Our data indicate that the frequency of sperm abnormalities found in our sample is comparable to the literature. The lack of association between the polymorphism studied and male infertility can be explained by the small sample size. But these results can not be generalized to all of our people. A large prospective study is needed to verify your results.

Keywords: male infertility, polymorphism, MTHFR gene.

ملخص

الهدف: العقم عند الرجال هو عدم قدرة الرجل على الإنجاب بسبب وجود خلل في حيواناته المنوية. المعرفة التشريحية و الفيزيولوجية أمر ضروري لفهم آليات مختلفة من العقم عند الذكور. الهدف من عملنا هو إقامة دراسة إحصائية لمجموعة من المرضى يعانون من العقم من خلال دراسة استطلاعية من جهة وللتحقيق في ارتباط محتمل بين تعدد الأشكال C677T من الجين MTHFR والعقم عند الذكور

المرضى والطرق: الدراسة التي اجريت من نوع مريض-غير مريض ، وأجريت على 12 مريضا يعانون من العقم (متوسط العمر: 33.58 سنة) و32 رجلا خصبة. تم استخراج الحمض النووي الجيني من الكريات البيضاء. تم إجراء البحث عن تعدد الأشكال C677T في جين MTHFR في المرضى والضوابط باستخدام طريقة Digestion / PCR

النتائج: نتائجنا تظهر أن فقد النطاف و عدم الحركة والتشوه هي شذوذ الحيوانات المنوية الأكثر شيوعا. وفقا لنتائج الدراسة الجزيئية، أي ارتباط بين تعدد الأشكال C677T والعقم عند الذكور.

الاستنتاج: البيانات المتوفرة لدينا تشير إلى أن وتيرة تشوهات الحيوانات المنوية وجدت في عينة لدينا هو مشابه مع ما وجد في باقي الدراسات. عدم وجود ارتباط بين تعدد الأشكال الذي درس والعقم عند الذكور ويمكن تفسير ذلك صغر حجم العينة. ولكن هذا النتائج لا يمكن تعميمها على جميع شعبنا. و هنا حاجة إلى دراسة مستقبلية كبيرة للتحقق من نتائجنا.

الكلمات المفتاحية: العقم عند الرجال، تعدد الأشكال، الجين MTHFR

Année universitaire : 2013- 2014	Présenté par : BOULABIZA NAWEL GHODBANE ZAHRA
Polymorphisme C677T du gène MTHFR et infertilité masculine	
<p>Objectif : l'infertilité masculine est l'impossibilité pour un homme de procréer du fait d'un défaut de son sperme. Les connaissances anatomophysiologique sont indispensables pour la compréhension des différents mécanismes de l'infertilité masculine. L'objectif de notre travail est d'établir une étude statistique sur un ensemble de patients infertiles à travers une enquête prospective d'une part et de rechercher d'éventuelle association entre le polymorphisme C677T du gène MTHFR et l'infertilité masculine.</p> <p>Patients et méthodes : notre étude est de type cas-témoins, elle a été menée sur 12 patient infertiles (l'âge moyen : 33,58 ans) et 32 hommes fertiles. L'ADN génomique a été extrait à partir des leucocytes. La recherche du polymorphisme C677T du gène MTHFR pour les patients et les témoins a été réalisée en utilisant la méthode PCR/digestion.</p> <p>Résultats : nos résultats montrent que l'azoospermie et l'astheno-téatospermie sont les anomalies spermatiques les plus fréquentes. Selon les résultats de l'étude moléculaire, il n'existe pas de d'association entre le polymorphisme C677T et l'infertilité masculine.</p> <p>Conclusion : nos données indiquent que la fréquence des anomalies spermatiques retrouvées dans notre échantillon est comparable à celle de la littérature. L'absence d'association entre le polymorphisme étudié et l'infertilité masculine peut être expliquée par la taille faible de l'échantillon. Mais ces résultats ne peuvent pas être généralisables à l'ensemble de notre population. Une grande étude éventuelle est nécessaire pour vérifier nos résultats.</p>	
Mots clés : infertilité masculine, polymorphisme, gène MTHFR.	
<p>Jury d'évaluation :</p> <p>Président du jury : L ROUABAH Prof Université Constantine1</p> <p>Rapporteur : DCHELLAT-REZGOUNEMC.B Université Constantine1</p> <p>Examineur : H ZIADA-BOUCHAAR MA.A Université Constantine1</p>	
Structure de recherche : Laboratoire de Biologie et génétique Moléculaire (UC3), Laboratoire central de l'Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine	
<i>Soutenu publiquement le jeudi 26-062014</i>	

