

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université des Frères Mentouri Constantine

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie Animale

قسم بيولوجيا الحيوان

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Génétique**

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**DIAGNOSTIC PAR PCR DES MICRODELETIONS DU CHROMOSOME Y  
DANS LE CADRE DE LA PRISE EN CHARGE DES INFERTILITES  
MASCULINES.**

---

**Présenté et soutenu par : ZEGHICHI MOHAMED RAGHEB AIMENE**

**Le 17/07/2019**

**Jury d'évaluation :**

**Président :** Mme. SATTI Dalila (Pr - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Encadreur :** Mr. BENZAADA Mostefa (MCB - Université de Khenchela)

**Examineur :** Mr. REZGOUN Mohamed Larbi (MCA - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire  
2018 - 2019**

---

## *Remerciements & Dédicaces*

---

## ***Remerciements***

***A Dieu le tout puissant « Allah »***

Merci de m'avoir donné la force, la volonté et le courage pour pouvoir réaliser ce modeste travail.

***A Mme. Le Professeur SATTA DALILA*** La présidente du jury.

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de mémoire tous mes remerciements les plus respectueux.

***A Mr. Le Dr. REZGOUNE MOHAMED LARBI*** l'examineur.

Qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être l'examineur de ce travail  
Sincères remerciements.

A mon promoteur de thèse ***Mr. BENSADA Mostefa*** j'ai eu le privilège de travailler sous votre instruction et d'apprécier vos qualités et vos valeurs.

Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir.

Veillez trouver ici l'expression de mes respectueuses considérations et ma profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines. Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.

A tous les enseignants et le personnel du ***Département de Biologie Animale***  
de Constantine.

Un grand merci pour toute la clinique **IBN ROCHD**.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail  
Merci.

## ***Dédicace***

Je dédie ce travail à :

### **A ma très chère mère**

Honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière m'a été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

### **A mon Père**

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

### **A mes très chers frères et ma sœur**

Mes chers frères qui m'ont facilité le chemin par leurs bonnes consignes de vie, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

**A ma grande famille maternelle et paternelle, tous mes grands-parents, mes oncles et mes tantes vivants et morts.**

### **A mes chers amis**

Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>AKAP4</b>	A-Kinase Anchoring Protein 4
<b>APOB</b>	Apolipoprotéine B
<b>AURKC</b>	Aurora Kinase C
<b>AZF</b>	Azoospermia Factor
<b>BET</b>	Bromure d'éthidium
<b>BPY2</b>	Basic Charge Y-Linked 2
<b>CDY1</b>	Testis-specific chromodomain protein Y 1
<b>DAZ</b>	Deleted in azoospermia
<b>DNTP</b>	DésoxyNucléotides Triphosphates
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>EDTA</b>	EthyleneDiamineTetraacetic acid
<b>FSH</b>	Follicle Stimulating Hormone
<b>GnRH</b>	Gonadotropin Releasing Hormone
<b>GSTM1</b>	Glutathione S-Transferase Mu 1
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency
<b>LH</b>	Luteinizing Hormone
<b>MSY</b>	Male-Specific Region
<b>OATS</b>	OligoAsthenoteratozoospermie
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PAR</b>	PseudoAutosomal Region
<b>PBS</b>	Phosphate-Buffered Saline
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PK</b>	Protéinase K
<b>PMA</b>	Procréation Médicalement Assistée
<b>PRY</b>	PTPN13 Like Y-Linked
<b>RBMV</b>	RNA Binding Motif Protein, Y-Linked
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>SOX8</b>	SRY-related HMG-box
<b>SPATA16</b>	Spermatogenesis Associated 16
<b>SRY</b>	Sex-determining Region Y
<b>STS</b>	Sequence-Tagged Sites

<b>SYCP1</b>	Synaptonemal Complex Protein 1
<b>TBE</b>	Tris Borate, EDTA
<b>T<sub>h</sub></b>	Température d'hybridation
<b>T<sub>m</sub></b>	Température de demi-dénaturation
<b>UBE2B</b>	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2B
<b>USP9Y</b>	Ubiquitin-Specific Peptidase 9 Y-Linked
<b>UV</b>	Ultra-Violet
<b>Y<sub>p</sub></b>	bras court du chromosome y
<b>Y<sub>q</sub></b>	bras long du chromosome y

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structure des testicules.....	2
<b>Figure 2</b> : Les étapes de la spermatogénèse.....	3
<b>Figure 3</b> : Structure du spermatozoïde.....	4
<b>Figure 4</b> : Contrôle hormonal de la spermatogénèse.....	5
<b>Figure 5</b> : les différentes anomalies des spermatozoïdes.....	10
<b>Figure 6</b> : Le syndrome de Klinefelter. ....	11
<b>Figure 7</b> : les différents compartiments du chromosome Y. ....	15
<b>Figure 8</b> : L'emplacement symbolique des palindromes dans le chromosome Y.....	17
<b>Figure 9</b> : les différentes recombinaisons créant les microdélétions.....	18
<b>Figure 10</b> : Caryotype en bande R.....	22
<b>Figure 11</b> : la localisation des amorces utilisées. ....	31
<b>Figure 12</b> : Pourcentage des résultats du spermogramme.....	35
<b>Figure 13</b> : Un caryotype non-réarrangé effectué sur un de nos patients.....	36
<b>Figure 14</b> : le même caryotype après classement.....	36
<b>Figure 15</b> : Amplification par l'enzyme NEWENGLAND BioLabs.....	38
<b>Figure 16</b> : Amplification simplexe de l'ADN génomique.....	39
<b>Figure 17</b> : Amplification multiplexe des régions AZF et SRY.....	42

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Les gènes retrouvés dans la région MSY.....	16
<b>Tableau 2 :</b> Les recombinaisons possibles lors des microdélétions du chromosome Y.....	19
<b>Tableau 3 :</b> Les taux normaux des hormones : Testostérone, FSH, LH.....	22
<b>Tableau 4 :</b> Les amorces utilisées dans notre étude. ....	32
<b>Tableau 5 :</b> Le protocole de PCR pour la Taq polymérase NEWENGLAND BioLabs. ...	33
<b>Tableau 6 :</b> Le protocole de PCR pour la GENEON. ....	33
<b>Tableau 7 :</b> Le protocole général de Thermocycleur.....	33
<b>Tableau 8 :</b> Les résultats du spermogramme.....	35
<b>Tableau 9 :</b> La concentration des ADN dosées par spectrophotométrie. ....	37
<b>Tableau 10 :</b> résultats des PCR selon l'enzyme utilisée. ....	39
<b>Tableau 11 :</b> Résumé des résultats de l'amplification du locus AZF.....	40
<b>Tableau 12 :</b> les résultats de PCR obtenus pour notre échantillon.....	41

# Table des matières

Introduction générale .....	1
-----------------------------	---

## **Revue bibliographique**

### **Chapitre I Rappels sur la spermatogénèse**

1. Les testicules .....	2
2. La spermatogénèse .....	3
2.1 Le spermatozoïde .....	4
2.2 Contrôle hormonal de la spermatogénèse .....	4

### **Chapitre II Les causes de l'infertilité masculine**

1. Définition de l'infertilité .....	6
2. Les causes non-génétiques de l'infertilité .....	6
2.1 Les causes infectieuses.....	6
2.1.1 Les causes bactériennes.....	6
2.1.2 Les infections virales.....	6
2.1.3 Les parasitoses.....	7
2.2 Les causes immunologiques et inflammatoires.....	7
2.2.1 La prostatite.....	7
2.2.2 L'épididymite.....	7
2.2.3 L'orchite.....	7
2.2.4 L'obésité.....	7
2.3 Etiologie pré-testiculaire .....	7
2.4 Etiologie testiculaire primaire .....	7
2.5 Etiologie post-testiculaire.....	8
2.6 Les causes endocriniennes .....	8
2.6.1 L'hypogonadisme Primaire .....	8
2.6.2 L'hypogonadisme secondaire.....	8
2.6.3 Le diabète de type II.....	8
2.6.4 Le dysfonctionnement thyroïdien.....	8
2.6.5 Les récepteurs à androgènes.....	8
2.7 Les traumatismes et les torsions.....	9
2.8 L'infertilité secondaire à une chimio ou/et radiothérapie.....	9
2.9 Les rayonnements ionisants .....	9
2.10 Les causes environnementales .....	9
2.11 Les anomalies du spermatozoïde.....	9
3. Les causes génétiques de l'infertilité masculine .....	10
3.1 Les anomalies chromosomiques de nombre.....	10

3.1.1	Le syndrome de Klinefelter.....	10
3.1.2	Le syndrome de XX.....	11
3.1.3	Le syndrome XO/XY en mosaïque.....	11
3.2	Les anomalies de structure.....	11
3.2.1	Les translocations robertsoniennes.....	11
3.2.2	Le chromosome Y en anneau.....	12
3.2.3	Translocations réciproques.....	12
3.2.4	L'isochromosome Y.....	12
3.2.5	Les délétions macroscopiques du chromosome Y.....	12
3.2.6	Les délétions microscopiques du chromosome Y.....	12
3.3	L'épigénétique.....	13
3.4	Les causes géniques.....	13
3.4.1	Les gènes dont l'altération conduit à une aspermie.....	13
3.4.2	Les gènes dont l'altération conduit à une azoospermie.....	13
3.4.3	Les gènes ou l'altération conduit à une oligozoospermie.....	14
3.4.4	Les gènes ou l'altération conduit à une asthenozoospermie.....	14
3.4.5	Les gènes ou l'altération conduit à une teratozoospermie.....	14
3.4.6	Les gènes ou l'altération conduit à une OATS.....	14

### **Chapitre III Les microdélétions du chromosome Y**

1.	Rappels sur la structure du chromosome Y.....	15
2.	Les mécanismes des microdélétions du chromosome Y.....	17

### **Chapitre IV démarche du diagnostic**

1.	Le diagnostic de l'infertilité masculine.....	21
2.	Le spermogramme.....	21
2.1	Les caractéristiques macroscopiques du sperme :.....	21
2.2	Les caractéristiques microscopiques du sperme :.....	21
3.	Le bilan hormonal.....	22
4.	Le caryotype.....	22
5.	La recherche des microdélétions du chromosome Y.....	23
	L'objectif du travail.....	24

### **Partie Pratique**

Introduction.....	25
-------------------	----

### **Méthode & Matériel**

1. Lieu et Période de l'étude.....	26
------------------------------------	----

2.	Population .....	26
3.	Le choix des patients .....	26
3.1	Lecture du dossier médical.....	26
3.2	Spermogramme .....	26
3.3	Bilan hormonal.....	26
3.4	Le caryotype.....	26
3.4.1	Prélèvement.....	26
3.4.2	Culture Lymphocytaires.....	27
3.4.3	Obtention des métaphases .....	27
3.4.4	Choc hypotonique .....	27
3.4.5	Préfixation .....	27
3.4.6	Fixation .....	27
3.4.7	Etalement.....	27
3.4.8	Marquage chromosomique.....	28
4.	Mise au point du protocole expérimental.....	28
4.1	Extraction de l'ADN .....	28
4.2	Dosage de l'ADN.....	29
4.3	Lancement de la PCR.....	29
4.3.1	Réactifs utilisés pour la PCR.....	30
4.3.2	Température d'hybridation.....	31
4.3.3	Protocole de PCR : .....	32
4.3.4	Les phases de réaction de PCR.....	33
4.3.5	Contrôle des produits de PCR .....	34
4.4	Les mises au point.....	34

## **Résultats & Discussion**

1.	Spermogramme : .....	35
2.	Caryotype .....	36
3.	Bilan hormonal.....	36
4.	Origine de l'ADN utilisé.....	37
4.1	Extraction de l'ADN et son dosage.....	37
5.	Résultat de l'analyse moléculaire.....	38
5.1	Les enzymes .....	38
5.1.1	Les résultats des PCR selon l'enzyme utilisée : .....	38
5.2	Les conditions de température d'hybridation : .....	39
5.3	Résultats des PCR pour l'ensemble des patients.....	40

## **Conclusion & Perspective**

Performance du test de diagnostic moléculaire.....44

## **Références bibliographiques**

---

## *Introduction générale*

---

## **INTRODUCTION GENERALE**

L'infertilité masculine est une pathologie humaine qui souffre d'une réelle prise en charge dans notre pays. Seuls le bilan hormonal et le spermogramme sont utilisés en routine, avec des résultats souvent peu indicatifs, d'où la nécessité de procéder à d'autres tests plus informatifs. Le caryotype est souvent une bonne alternative, même si elle reste limitée et coûteuse, qui révèle les individus ayant des remaniements chromosomiques majeurs : syndrome de Klinefelter ou translocations impliquant les chromosomes X et Y (7% à 9% de cas d'azoospermie).

Les microdélétions du chromosome Y sont responsables de près de 10% de cas d'infertilité masculine, elles conduisent à une azoospermie ou une oligozoospermie sévère d'où l'incapacité d'engendrer, en cause une spermatogénèse défailante. L'analyse de ces microdélétions par les outils de la biologie moléculaire en particulier la Polymerase Chain Reaction (PCR) est un excellent moyen de diagnostic, puisqu'elle est une technique fiable, robuste et peu onéreuse. Malheureusement, cette technique est non disponible dans la pratique quotidienne de nos médecins et afin de répondre à cette lacune, nous avons voulu mettre au point un protocole simple rapide et peu onéreux, pour la prise en charge de cette pathologie.

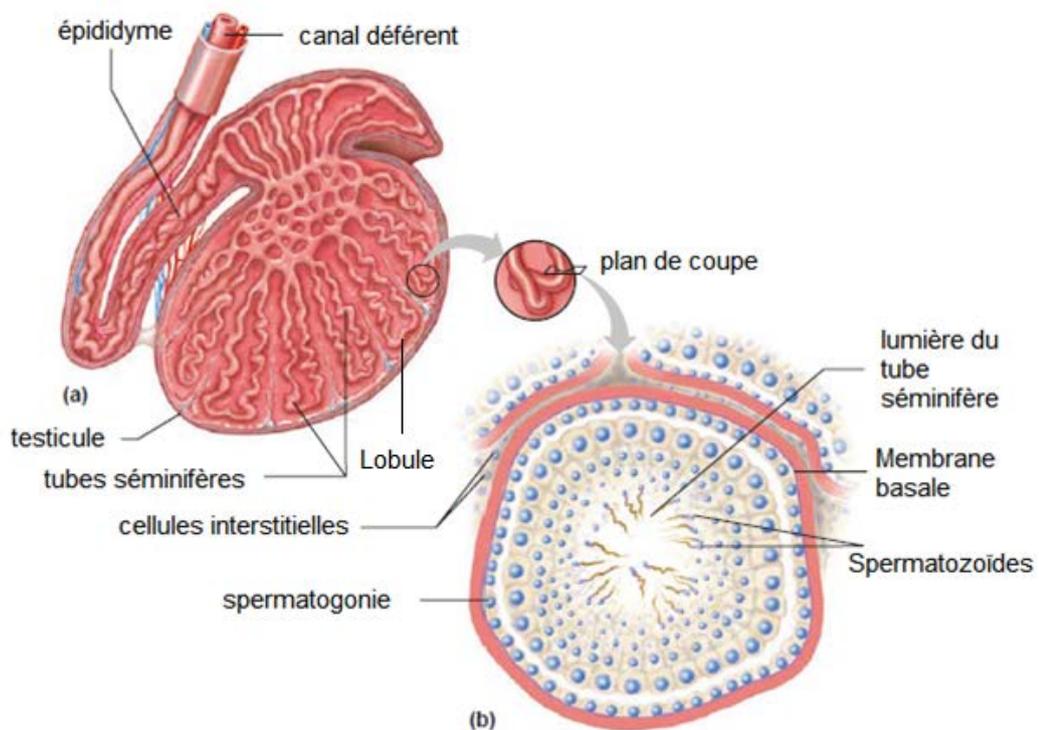
---

*Revue bibliographiques*

---

## 1. Les testicules

Les testicules sont les organes où se déroule la spermatogénèse. De structures ovoïdes, ils sont placés dans la cavité scrotale de façon permanente (Shier, et al., 2011). Chaque testicule est composé de 250 lobules, le lobule à son tour contient un à quatre tubes séminifères, chacun d'environ 70 centimètres de long. Ces tubes s'unissent pour former un réseau complexe qui donne naissance à plusieurs canaux qui rejoignent un seul tube appelé épiddidyme. L'épiddidyme est enroulé sur la surface externe du testicule et devient le canal déférent (Shier, et al., 2011) (**Figure 1**). Un épithélium stratifié tapisse la membrane basale des tubes séminifères est composé de cellules de Sertoli et de spermatogonies (cellules germinales souches), qui donnent naissance à la fin à des spermatozoïdes. D'autres cellules spécialisées coexistent avec les cellules de Sertoli, appelées cellules interstitielles (cellules de Leydig), elles se trouvent dans les espaces entre les tubes séminifères, ces cellules produisent et sécrètent des hormones sexuelles mâles (Shier, et al., 2011).



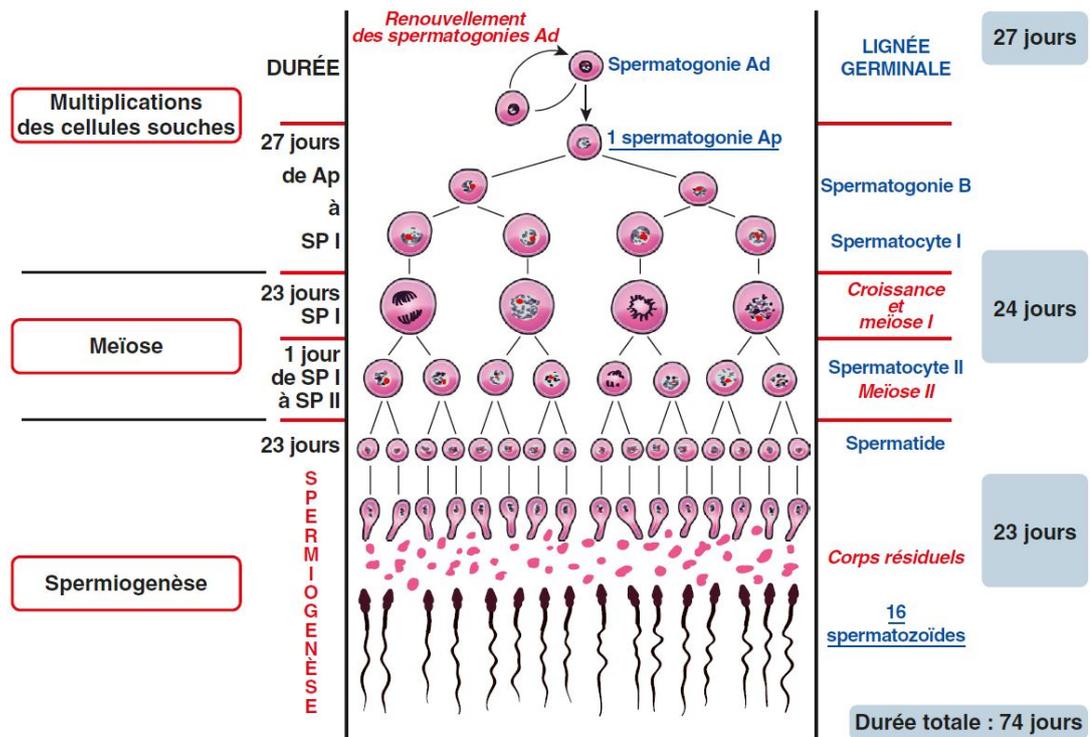
**Figure 1** : Structure des testicules. (a) Coupe sagittale du testicule. (b) Coupe transversale du tube séminifère (Shier, et al., 2011).

## 2. La spermatogénèse

La spermatogénèse se définit comme le développement des cellules germinales mâles, à partir de spermatogonies, cellules souches à  $2n$  chromosomes donnant des spermatozoïdes matures à  $n$  chromosomes (Guérin, 2016).

La spermatogénèse se déroule en trois étapes (**Figure 2**) (Guérin, 2016):

- Phase de multiplication : Cette phase a pour but d'augmenter le nombre des cellules qui vont entrer en division méiotique. Les spermatogonies souches sont de type Ad, elles constituent une forme de réserve pour les cellules germinales, lors de la première division, elles donnent deux cellules filles une de type Ap et l'autre identique à elle-même, les cellules Ap se multiplient à leurs tours pour donner des cellules de type B qui continuent leurs divisions pour donner un spermatocyte I.
- Phase de méiose : A la fin de la phase de méiose, chaque spermatocyte I donne 4 spermatides à  $n$  chromosome chacune.
- Phase de différenciation : la spermiogénèse. C'est la phase de maturation donnant des spermatozoïdes matures.



**Figure 2 :** Les étapes de la spermatogénèse (Guérin, 2016).

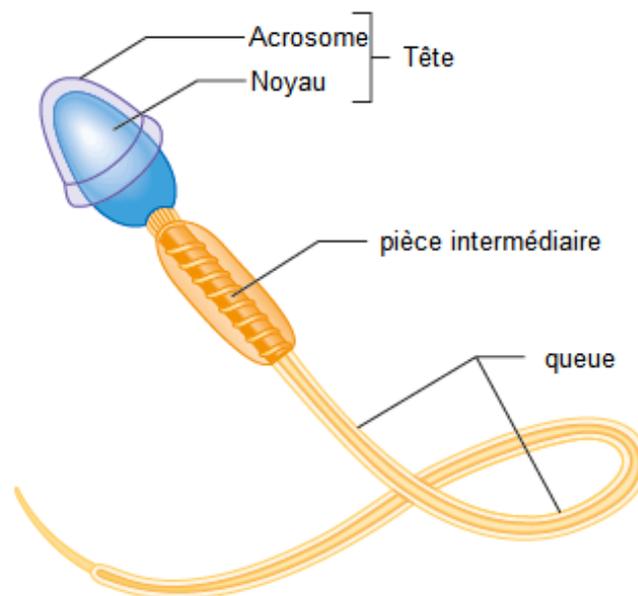
## 2.1 Le spermatozoïde

Le spermatozoïde (**Figure 3**) est une cellule allongée, de 60 microns de longueur. Composé par (Auger, 2018):

Une tête conique aplatie sombre, contenant le noyau qu'est constitué principalement d'une chromatine très condensée, occupant la plus grande partie de la tête. La partie antérieure du noyau est coiffée par l'acrosome.

Une pièce intermédiaire : cette partie renferme des substances productrices d'énergie (mitochondries), qui se chargent de propulser le spermatozoïde dans sa course vers l'ovule.

Un flagelle : c'est grâce à lui que le spermatozoïde peut se déplacer.

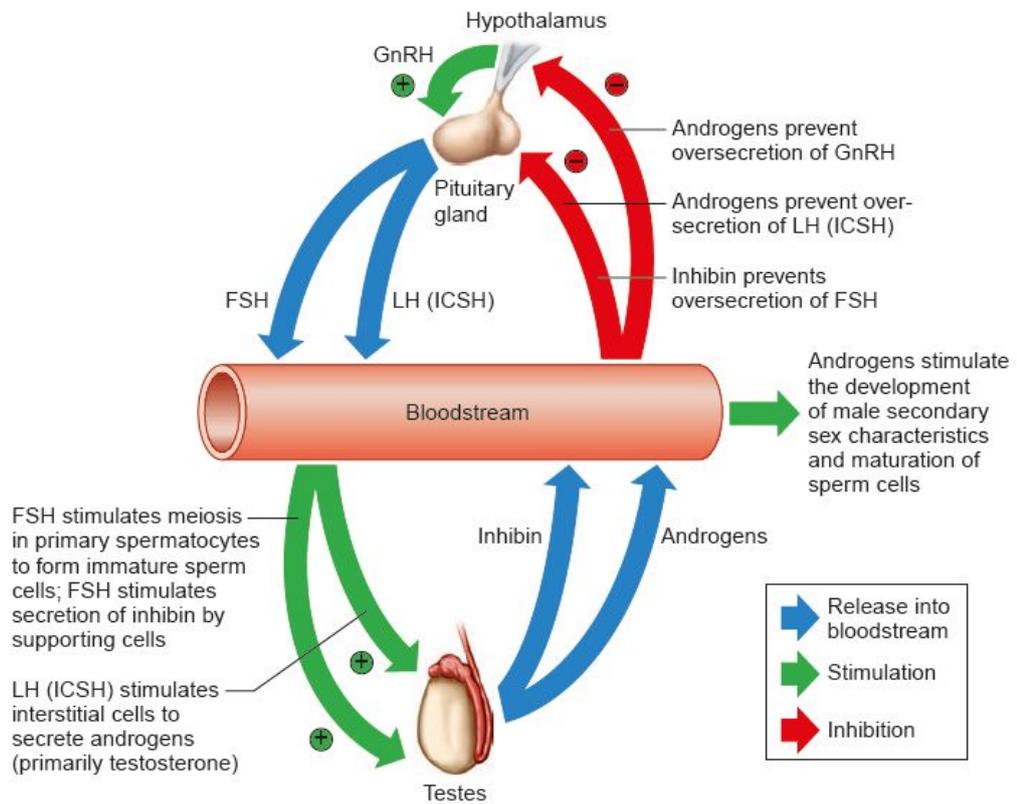


**Figure 3** : Structure du spermatozoïde (Shier, et al., 2011).

## 2.2 Contrôle hormonal de la spermatogénèse

La spermatogénèse est régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire (**Figure 4**). L'hypothalamus secrète de façon pulsatile la Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), qui rejoint l'hypophyse antérieure, ce qui déclenche la libération de deux gonadotropines : la Follicle Stimulating Hormone (FSH) responsable du déclenchement et du maintien de la spermatogénèse, elle se fixe sur les récepteurs membranaires des cellules de Sertoli ; la Luteinizing Hormone (LH) dont l'action principale se passe sur les cellules de Leydig, elle

assure la multiplication des cellules de Leydig et la sécrétion de testostérone qui stimule la synthèse des spermatozoïdes (De Kretser, et al., 2016).



**Figure 4 :** Contrôle hormonal de la spermatogénèse (Shier, et al., 2011).

## 1. Définition de l'infertilité

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a retenu comme définition pour l'infertilité d'un couple comme étant l'échec de concevoir après au moins 12 mois de rapports sexuels non protégés. L'infertilité touche environ 15 % des couples dans le monde dont plus de 50% des cas est une cause masculine (Thonneau, et al., 1991). L'infertilité masculine peut être diagnostiquée lors d'un déficit de quantité, de mobilité, de la morphologie et/ou du fonctionnement des spermatozoïdes (McElreavey, et al., 2002). Multiples causes peuvent conduire à une infertilité masculine, on peut les subdiviser en causes non-génétique et causes génétique (Rodríguez, et al., 2018).

## 2. Les causes non-génétiques de l'infertilité

### 2.1 Les causes infectieuses

#### 2.1.1 Les causes bactériennes

On peut classer les bactéries en deux catégories :

Les infections sexuellement transmissibles comme :

- *La Neisseria gonorrhoeae* : l'infection gonadique par cette bactérie peut entraîner une azoospermie ou une oligozoospermie permanente.
- *La Chlamydia trachomatis* : Qui conduit à l'infertilité masculine en provoquant une apoptose des cellules germinales souches mâle.
- *L'Ureaplasma urealyticum* : Qui provoque des modifications morphologiques dans les tubes séminifères en plus d'une altération de la spermatogénèse.

Les infections non sexuelles transmissibles

- *Escherichia coli* : l'infection par cette bactérie entraîne une immobilisation et une altération de la fonction acrosomale des spermatozoïdes.
- *Brucella melitensis* : Cette bactérie provoque une épididymo-orchite qui conduit généralement à une oligozoospermie ou à une azoospermie.

#### 2.1.2 Les infections virales

Les virus de l'hépatite B, l'hépatite C et le Human Immunodeficiency (HIV) sont associés à la détérioration du nombre, de la motilité et de la morphologie des spermatozoïdes (Nicolopoulos, et al., 2004; Lorusso, et al., 2010).

### 2.1.3 Les parasitoses

Le parasite le plus retrouvé dans l'infertilité masculine est le *Trichomonas vaginalis* entraînant une réduction de la motilité du sperme.

## 2.2 Les causes immunologiques et inflammatoires

Quand l'inflammation affecte le tissu testiculaire elle provoque une défaillance dans la qualité du sperme produit (Azenabor, et al., 2015; Rodríguez, et al., 2018).

### 2.2.1 La prostatite

Une étude faite en 1994 a montré la corrélation entre l'augmentation des marqueurs prostatiques et l'apparition de défauts morphologiques du sperme.

### 2.2.2 L'épididymite

Toute inflammation de l'épididyme peut entraîner une diminution du nombre, une altération de la motilité ou un dysfonctionnement des spermatozoïdes.

### 2.2.3 L'orchite

L'orchite peut être causée par des agents infectieux mais aussi par des causes auto-immunes, l'état fébrile des testicules peut conduire à un arrêt de la spermatogénèse.

### 2.2.4 L'obésité

Les hommes obèses présentent des troubles hormonaux accompagnés des défauts dans la production d'androgènes et d'œstrogènes se traduisant par une altération de la spermatogénèse (Plessis, et al., 2010).

## 2.3 Etiologie pré-testiculaire

Elle comprend principalement deux types de pathologies : le déficit hormonal, l'hypogonadisme hypogonadotrope et les troubles coïtaux (dysfonction érectile, troubles éjaculatoires tels que l'éjaculation précoce, l'éjaculation rétrograde) (Zini & Chokron, 2004; Krausz, 2011).

## 2.4 Etiologie testiculaire primaire

Due à un défaut de spermatogénèse primaire. La cryptorchidie (surtout les formes bilatérales), les torsions, les formes iatrogènes, la chimiothérapie et radiothérapie (Zini & Chokron, 2004; Krausz, 2011).

## **2.5 Etiologie post-testiculaire**

Elle comprend toutes les lésions obstructives (obstruction des voies génitales), sub-obstructives du tractus séminal (distal ou proximal), on peut aussi ajouter toutes les anomalies des glandes annexes (Zini & Chokron, 2004; Krausz, 2011).

## **2.6 Les causes endocriniennes**

### **2.6.1 L'hypogonadisme Primaire**

L'hypogonadisme Primaire ou hypogonadisme hypergonadotrope est l'association des taux élevés de gonadotrophine (LH, FSH) à un faible taux de testostérone, il est retrouvé généralement chez les patients Klinefelter (Jarow, 2003).

### **2.6.2 L'hypogonadisme secondaire**

L'hypogonadisme secondaire ou hypogonadisme hypogonadotrope est l'association de faible taux de gonadotrophine (LH, FSH) et de testostérone, c'est le type retrouvé chez les patients du syndrome Kallman, aussi toute atteintes ou modifications de la glande pituitaire.

### **2.6.3 Le diabète de type II**

Ces effets sont principalement dus à la neuropathie autonome et aux maladies microvasculaires qui affectent l'éjaculation, l'érection et même la spermatogénèse (Jarow, 2003).

### **2.6.4 Le dysfonctionnement thyroïdien**

Le dysfonctionnement thyroïdien est rare chez les hommes surtout jeunes, de plus les malades ont des signes très apparents (Jarow, 2003).

### **2.6.5 Les récepteurs à androgènes**

Les androgènes sont essentiels pour le déterminisme masculin et l'initiation de la spermatogénèse, l'altération des gènes codant pour des récepteurs aux androgènes par exemple, sont à l'origine d'un phénotype féminin avec une insensibilité complète aux androgènes chez des patients XY, mais aussi chez des sujets avec une insensibilité légère aux androgènes qui ont l'infertilité comme symptôme principal ou même unique (Eduardo, et al., 2013).

## **2.7 Les traumatismes et les torsions**

Les traumatismes des testicules induisent la libération de facteurs activateurs de l'apoptose (cytokines), ce qui provoque ensuite une apoptose étendue dans les tissus germinaux. Par conséquent, les épisodes d'apoptose répétés expliquent la forte incidence d'infertilité chez ces patients (Hadziselimovic, et al., 1998).

## **2.8 L'infertilité secondaire à une chimio ou/et radiothérapie**

Les agents chimiothérapeutiques ont un effet cytotoxique interrompant des processus cellulaires essentiels. La gonade masculine est très sensible aux effets toxiques de la chimiothérapie par rapport aux autres tissus, de ce fait il y aura des modifications au niveau tissulaire comme l'élimination de cellule de Leydig.

## **2.9 Les rayonnements ionisants**

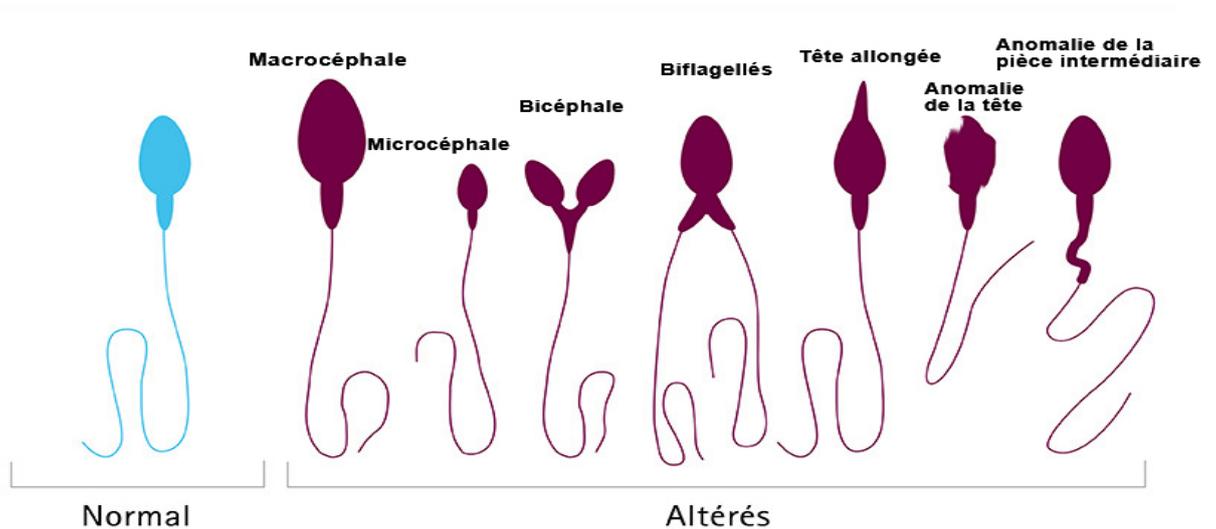
Les rayonnements ionisants exposés directement vers les testicules induisent des dommages potentiellement irréversibles à l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) cellulaire pendant la réplication, ce qui inhibe la division cellulaire. En plus de l'échec de la spermatogenèse, les rayonnements provoquent un dysfonctionnement des cellules de Leydig et une éventuelle atrophie testiculaire (Meirow & Schenker, 1995).

## **2.10 Les causes environnementales**

L'environnement et les habitudes personnelles des hommes peuvent influencer leur fertilité : comme porter des pantalons serrés, prendre des bains chauds, boire de l'alcool à l'excès, fumer du tabac ou du cannabis.

## **2.11 Les anomalies du spermatozoïde**

Les anomalies et les malformations du spermatozoïde, (**Figure 5**) peuvent conduire à une infertilité masculine (OMS, 2010).



**Figure 5** : les différentes anomalies des spermatozoïdes (Merck, 2013).

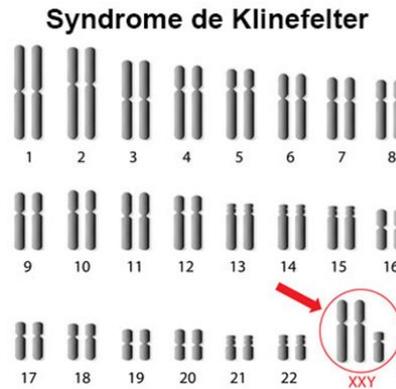
Les anomalies de la tête : Elles englobent : microcéphales, macrocéphales, tête allongée et tête irrégulière. Aussi elles englobent les globozoocéphales : Caractérisés par l'absence de l'acrosome (aucune possibilité de féconder) ; anomalie de la pièce intermédiaire, avec présence de restes cytoplasmiques ; anomalies du flagelle angulé ou flagelle enroulé (Guichaoua, et al., 2009).

### 3. Les causes génétiques de l'infertilité masculine

#### 3.1 Les anomalies chromosomiques de nombre

##### 3.1.1 Le syndrome de Klinefelter

Les porteurs de syndrome de Klinefelter sont des hommes avec un chromosome sexuel X en plus (47, XXY) (**Figure 6**), ils sont caractérisés par un taux de FSH élevé et un taux de testostérone faible, leur stérilité vient de l'absence totale des cellules germinales (Bojesen, et al., 2003; Borghet & Wyns, 2018).



**Figure 6 :** Le syndrome de Klinefelter (Chaine, 2019).

### 3.1.2 Le syndrome de XX

Les malades du syndrome XX ont un trouble testiculaire lors du développement sexuel, la cause la plus courante est une translocation (Xp ; Yp) incluant le gène Sex-determining Region Y (SRY), la région déterminante pour le sexe, qui initie et maintient le phénotype masculin (Schiebel, et al., 1997). Les hommes 46, XX sont uniformément stériles, car ils ne possèdent pas la région Azoospermia Factor (AZF) nécessaires à une spermatogenèse normale (Patrat, et al., 2010).

### 3.1.3 Le syndrome XO/XY en mosaïque

Le syndrome XO/XY est caractérisé par une anomalie gonosomique et les individus atteints sont caractérisés par un très large spectre phénotypique, hommes d'apparence normal, femmes avec ou sans profils turnériens et parfois présentant une ambiguïté avec un degré variable de masculinisation des organes génitaux externes (El Moussaif, et al., 2011).

## 3.2 Les anomalies de structure

### 3.2.1 Les translocations robertsoniennes

Elles se produisent exclusivement sur les chromosomes acrocentriques et ce type de translocations n'affecte pas toujours la spermatogenèse. Bien que peu de cas soient rapportés de cette anomalie, elle semble être plus fréquente chez les hommes ayant une faible concentration et/ou des modifications morphologies de sperme (Borghet & Wyns, 2018).

### **3.2.2 Le chromosome Y en anneau**

Les hommes stériles porteurs de chromosome Y en anneau ont un phénotype normal, le caryotype est souvent en mosaïque et 90 % des cas décrivent la présence d'une cassure au niveau du Y proche de la région AZF (May-Panloup, et al., 2009).

### **3.2.3 Translocations réciproques**

Une étude faite sur 19 hommes porteurs de translocations X autosomes, chez des hommes qui souffrent d'une perturbation de la spermatogenèse menant à une sous-fertilité ou une infertilité sévère, quelle que soit la position du point de rupture dans le chromosome X (Madan, 1983).

### **3.2.4 L'isochromosome Y**

L'isochromosome est un chromosome anormal constitué de deux bras identiques, soit longs, soit courts. Il survient lorsque le chromosome normal ne se divise pas longitudinalement mais transversalement. Les phénotypes les plus rapportés dans la littérature pour i(Yp) sont des ambiguïtés sexuelles. À l'inverse, pour i(Yq) et du fait de l'absence du gène SRY, les phénotypes sont féminins, avec des gonades réduites (Faure, 2007).

### **3.2.5 Les délétions macroscopiques du chromosome Y**

Cette anomalie est visible au caryotype, au contraire des microdélétions de la région Male-Specific Region (MSY) qui nécessitent une technique de biologie moléculaire. Les individus porteurs d'une délétion Yp affectant le gène SRY ont le plus souvent un phénotype féminin avec des stigmates de syndrome de Turner. Les délétions affectant la partie hétérochromatique en Yq12 sont compatibles avec une différenciation sexuelle normale. Les délétions plus larges englobant une ou plusieurs régions AZF sont responsables le plus souvent d'un phénotype masculin avec une atteinte sévère de la spermatogenèse (Faure, 2007).

### **3.2.6 Les délétions microscopiques du chromosome Y**

C'est une anomalie qui touche le chromosome Y, caractérisé par la délétion de certains gènes retrouvés dans la région AZF, ces gènes ont des rôles majeurs dans la spermatogénèse.

### 3.3 L'épigénétique

L'épigénétique se définit comme une altération d'expression des gènes sans en modifier la séquence d'ADN. Bien que la relation cause à effet exacte entre l'infertilité masculine et l'épigénétique n'a pas été complètement élucidée et des résultats contradictoires subsistent sur le rôle exact de la méthylation dans la littérature, certaines études montrent l'association des changements de méthylation de l'ADN spermatique à une infertilité masculine (Hammoud, et al., 2010).

### 3.4 Les causes géniques

Certains gènes sont impliqués dans la spermatogenèse, leur dysfonctionnement affecte la fertilité masculine, au niveau de la spermatogenèse ou/et au niveau de la fonction spermatique. Nous donnons dans la suite du paragraphe quelques exemples de gènes impliqués dans l'infertilité.

#### 3.4.1 Les gènes dont l'altération conduit à une aspermie

**SOX8**: SRY-related HMG-box. Le désordre de la production de la protéine codée par ce gène au niveau des cellules de Sertoli se traduit par une dérégulation de la spermatogenèse dépendante de l'âge (O'Bryan & et al, 2008).

#### 3.4.2 Les gènes dont l'altération conduit à une azoospermie

**APOB** : Apolipoprotéine B. Gène dont l'altération peut être un facteur de risque pour le développement de l'infertilité masculine par une azoospermie (Peterlin, et al., 2006).

**CDY1** : Testis-specific chromodomain protein Y1. Gène localisé dans la région AZFc dont la suppression est un facteur de risque significatif d'infertilité masculine (Lahn, et al., 2002; Ghorbel, et al., 2014).

**RBMY** : RNA Binding Motif Protein, Y-Linked. Gène localisé dans la région AZFb, sa suppression peut provoquer un arrêt méiotique complet des cellules germinales spermatiques (Kerem, et al., 1989; Vogt, 2005).

On peut aussi citer **SPATA16**, **SYCP1**, **USP9Y** dont leurs mutations ou délétions peuvent aboutir à l'absence totale des spermatozoïdes (Matzuk & DJ., 2008).

### **3.4.3 Les gènes ou l'altération conduit à une oligozoospermie**

**UBE2B** : Ubiquitin Conjugating Enzyme E2B. Gène codant pour une protéine appelée EB2. La mutation de ce gène conduit à une diminution des spermatozoïdes normaux et la majorité d'entre eux faisant apparaître des défauts au niveau des flagelles (Ben Khelifa, 2014).

### **3.4.4 Les gènes ou l'altération conduit à une asthenozoospermie**

**AKAP4** : A-Kinase Anchoring Protein 4. Gène entrant dans la constitution des voies de signalisation qui régulent la motilité des spermatozoïdes. Une mutation de ce gène donne une gaine fibreuse déstabilisée et un flagelle raccourci (Ben Khelifa, 2014).

### **3.4.5 Les gènes ou l'altération conduit à une teratozoospermie**

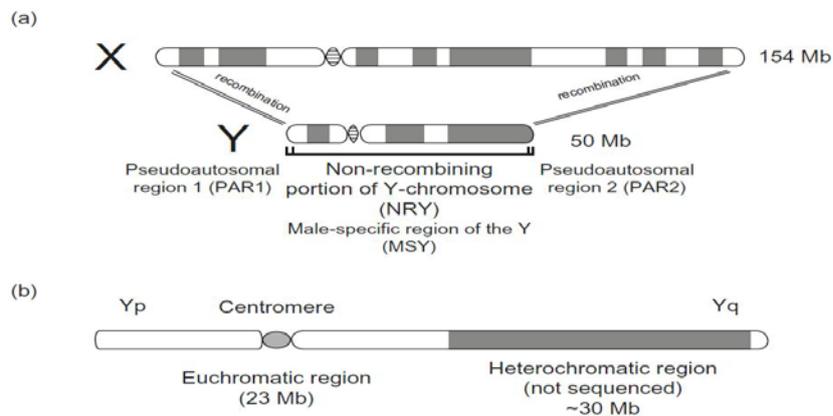
**AURKC** : Aurora Kinase C. Gène affectant la méiose et conduit à des spermatozoïdes macrocéphales (Ben Khelifa, 2014).

### **3.4.6 Les gènes ou l'altération conduit à une OATS**

Exemple du gène **POIA3** qui est responsable de la forme du spermatozoïde, la présence de l'acrosome intervenant dans la fécondation.

## 1. Rappels sur la structure du chromosome Y

L'homme possède deux chromosomes sexuels différents l'un de l'autre, le chromosome X retrouvé chez les deux sexes et le chromosome masculin Y. Le chromosome Y est essentiel dans le déterminisme sexuel masculin, plusieurs gènes entrent dans ce mécanisme dont le gène SRY joua un rôle clé (Tyler-Smith, 2013). Les extrémités du chromosome Y sont appelées « pseudoautosomal region » (PAR1) ; située à l'extrémité du bras court (Yp), tandis que la PAR2 est située à l'extrémité du bras long (Yq). C'est cette région PAR qui se recombine avec le chromosome X (Butler, 2012), le reste du chromosome est appelé MSY (Skaletsky & al, 2003). La région MSY est composée de deux portions (**Figure 7**): l'hétérochromatine de 30 Mb et l'euchromatine de 23 Mb et au total le chromosome Y est le troisième plus petit chromosome après le chromosome 21 et le chromosome 22 (Butler, 2012). Jusqu'à ce jour, 27 gènes ont été identifiés sur le chromosome Y, 9 sur le bras court et 18 sur le bras long. Parmi ces derniers, 12 sont exprimés de façon spécifique dans les testicules et sont nécessaires à la production de spermatozoïdes (Cram, et al., 2006).



**Figure 7** : les différents compartiments du chromosome Y (Butler, 2012).

Trois classes de séquences ont été identifiées dans le chromosome Y (**Tableau 1**) : c'est dans ces régions que se produisent les recombinaisons qui sont sources des microdélétions.

- La Region X-transposed : située sur le bras court de 3,2 Mb de taille, ces séquences sont identiques à 99% aux séquences retrouvées en Xq21 et contiennent deux gènes codants et ne participent pas à la recombinaison XY lors de la méiose masculine.

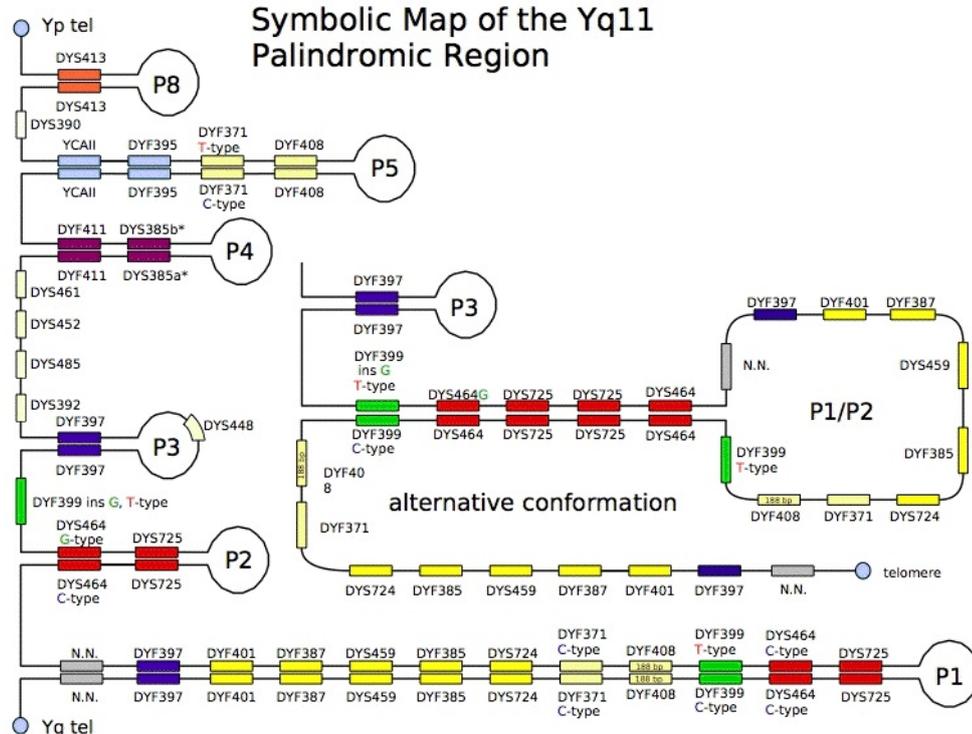
- **Tableau 1:** Les gènes retrouvés dans la région MSY.

MSY sequence	Gène	nombre de copie	TISSUE
X-transposed	TGIF2LY	1	Testicule
	PCDH11Y	1	cerveau Fetal, cerveau
TOTAL		2	
X-degenerate	SRY	1	prédominance Testiculaire
	RPS4Y1	1	Ubiquitaire
	ZFY	1	Ubiquitaire
	AMELY	1	dent
	TBL1Y*	1	Fetal cerveau, prostate
	PRKY	1	Ubiquitaire
	USP9Y	1	Ubiquitaire
	DBY	1	Ubiquitaire
	UTY	1	Ubiquitaire
	TMSB4Y	1	Ubiquitaire
	NLGN4Y	1	cerveau Fetal, cerveau, prostate, Testicule
	CYof15A	1	Ubiquitaire
	CYof15B	1	Ubiquitaire
	SMCY	1	Ubiquitaire
	EIF1AY	1	Ubiquitaire
	RPS4Y2	1	Ubiquitaire
TOTAL		16	
Amplificonic	TSPY	35	Testicule
	VCY	2	Testicule
	XKRY	2	Testicule
	CDY	4	Testicule
	HSFY	2	Testicule
	RBMV	6	Testicule
	PRY	2	Testicule
	BPY2	3	Testicule
	DAZ	4	Testicule
TOTAL		60	
GRAND TOTAL		78	

- La Région X-degenerate : de 8,6 Mb de taille, les séquences sont réparties en 8 blocs sur le bras court et le bras long du chromosome Y. Ces segments dégénérés possèdent jusqu'à 96% d'identité de séquence nucléotidique avec leurs homologues liés à l'X.
- La Région d'amplicon : de 10,2 Mb de taille, avec 7 blocs sur le bras court et le bras long du chromosome Y beaucoup d'entre eux sont des palindromes, c'est-à-dire que les séquences dupliquées sont homologues, mais inversées les unes par rapport aux autres, essentiellement sous forme d'images miroir.

## 2. Les mécanismes des microdélétions du chromosome Y

La région MSY contient de longues séquences dupliquées en tandem qui facilitent les délétions génomiques via une recombinaison homologue non allélique en raison des similarités de séquence des amplicons (**Figures 8 et 9**), elles provoquent souvent une défaillance de la spermatogénèse, du fait de leur contenu en gènes en particulier le locus AZF (Ravel, et al., 2006). Ces microdélétions touchent la région en Yq11, présentant trois loci AZFa, AZFb et AZFc contenant les principaux gènes responsables de la production de spermatozoïdes (Ghorbel, et al., 2014).



**Figure 8 :** L'emplacement symbolique des palindromes dans le chromosome Y (Krahn, 2006).

Tiepolo & Zuffardi ont rapportés la corrélation entre la région AZF et la spermatogénèse pour la première fois (Tiepolo & Zuffardi, 1976), en suite l'association entre la délétion de la région AZF et l'azoospermie et l'oligozoospermie sévère ont été confirmées. Depuis la description du gène Deleted in Azoospermia (DAZ), localisé dans la région AZFc, en 1995 par Reijo et ses collaborateurs, plusieurs études sur la relation entre l'infertilité masculine et les microdélétions de la région AZF. Environ 7,3% des 3000 individus infertiles étudiés présentaient des microdélétions sur le chromosome Y (Kent-First, et al., 1996; Simoni, et al., 1999).

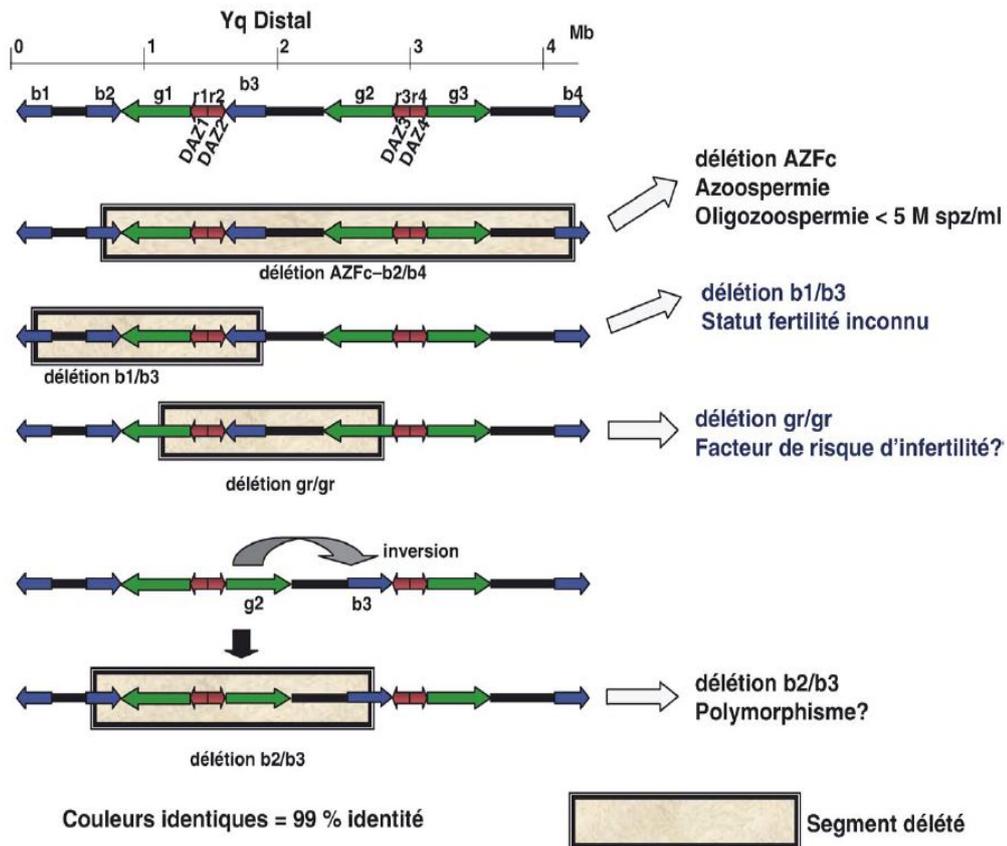


Figure 9 : les différentes recombinaisons créant les microdélétions (Ravel, et al., 2006).

**Tableau 2 :** les recombinaisons possibles lors des microdélétions du chromosome Y  
(PauloNavarro-Costa, 2012).

	Phénotype germinal	Gènes touchés / familles de gènes	Extension	Mécanisme du réarrangement
Suppression AZFa	Manque total de cellules germinales dans le testicule.	USP9Y et DDX3Y	800 kb	Recombinaison homologue intrachromosomique entre deux éléments de rétrovirus endogènes humains (HERV) adjacents.
AZFb (délétion P5 / P1 proximale)	Arrêt de maturation de pratiquement toutes les cellules germinales en développement.	XKRY, CDY, HSFY, KDM5D, EIF1AY, RPS4Y2, RBMY1A1, PRY, BPY2 et DAZ	~ 6 Mo	Recombinaison homologue intrachromosomique entre les domaines proximaux des palindromes P5 et P1. Une minorité de ces délétions sont également le résultat de mécanismes de recombinaison non basés sur l'homologie
AZFb + c (délétion P5 / P1 distale)	Identique à celle des suppressions AZFb.	Identique à celle des suppressions AZFb. Les familles de gènes BPY2 et DAZ sont complètement supprimées.	~ 8 Mo	Recombinaison homologue intrachromosomique entre les domaines distaux des palindromes P5 et P1. Une minorité de ces délétions sont également le résultat de mécanismes de recombinaison non basés sur l'homologie.
AZFc (suppression b2 / b4)	La production de spermatozoïdes fortement diminué en raison d'un degré mixte d'atrophie des cellules germinales dans les testicules.	BPY2, DAZ et CDY	~ 3,5 Mo	Recombinaison homologue intrachromosomique entre les amplicons b2 et b4 situés dans la partie distale des palindromes P3 et P1, respectivement.
gr / gr (AZFc partiel)	Facteur de risque d'atteinte spermatogène dans plusieurs populations européennes et océaniques.	Identique à celle des délétions AZFc, mais les trois familles de gènes ne sont pas entièrement supprimées.	~ 1.6 Mo	Recombinaison homologue intrachromosomique entre les deux blocs d'amplicon dans AZFc.
b2 / b3 (AZFc partiel)	Facteur de risque d'atteinte spermatogène dans plusieurs populations asiatiques. Ce risque dépend de la présence de duplications supplémentaires de AZFc.	Identique à celle des délétions AZFc, mais les trois familles de gènes ne sont pas entièrement supprimées.	~ 1.8 Mo	Recombinaison homologue intrachromosomique dans un domaine AZFb / c partiellement inversé. L'identité des amplicons impliqués dans l'événement de recombinaison varie en fonction du type d'inversion.

Les principaux gènes de la région AZF, impliqués dans la spermatogénèse :

**USP9Y** : (Ubiquitin-Specific Peptidase 9 Y-linked) : gène localisé dans la région AZFa, présent en copie unique sur le chromosome Y et est exprimé dans de nombreux tissus. Il joue un rôle de régulateur important au niveau du renouvellement protéique en empêchant leur dégradation par l'élimination de l'ubiquitine conjuguée (Faure, 2007)

**PRY et BPY2** : gènes localisés dans la région AZFb, leurs suppressions peuvent provoquer un arrêt méiotique complet des cellules germinales spermatiques (Vogt, 2005).

**DAZ** : gènes localisés dans la région AZFb et AZFc organisés en deux groupes et formant une paire de gènes DAZ. Ses paires sont retrouvées sur le chromosome Y dans les duplications palindromiques ; une paire de gènes fait partie du palindrome P2 et la seconde paire fait partie du palindrome P1. Ces gènes codent pour une protéine de liaison à l'ARN qui est importante pour la spermatogénèse. Leurs délétions aboutissent à une azoospermie (Reynolds & Howard, 2005).

## 1. Le diagnostic de l'infertilité masculine

Les procédés de diagnostic de l'infertilité sont nombreux et en l'absence d'une indication première le spermogramme est test de routine du praticien.

## 2. Le spermogramme

Le spermogramme est le premier examen effectué dans le cadre d'une infertilité masculine, au cours duquel sont analysées les différentes caractéristiques macroscopiques et microscopiques du sperme (Frydman, 2016).

### 2.1 Les caractéristiques macroscopiques du sperme :

- Aspect : opaque selon la concentration de spermatozoïdes.
- Viscosité : normale, faible ou forte.
- Volume : normal (1,5 à 6 mL), hypospermie, hyperspermie ou aspermie.
- PH : doit être entre 7,2 à 8.

### 2.2 Les caractéristiques microscopiques du sperme :

- Concentration des spermatozoïdes : nombre total des spermatozoïdes dans une éjaculat, une numération normale est supérieure à 39 millions/éjaculat.
- Numération des spermatozoïdes : C'est le nombre de spermatozoïdes par millilitre de sperme. Une concentration normale se situe entre 15 et 200 millions/mL.
  - A. L'oligozoospermie est une concentration inférieure à 15 millions/mL.
  - B. La polyzoospermie est une concentration supérieure à 200 millions/mL.
  - C. La cryptozoospermie : est la présence de rares spermatozoïdes, retrouvés après centrifugation de l'éjaculat.
  - D. L'azoospermie est l'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat avant et après centrifugation.
- Mobilité : supérieure ou égale 40%.
  - A. Asthenozoospermie : c'est la diminution de la mobilité des spermatozoïdes.
  - B. Akinétospermie : c'est une absence de spermatozoïdes mobiles.
  - C. Agglutinations de spermatozoïdes : c'est l'attachement de spermatozoïdes entre eux.
- vitalité : une vitalité normale est égale ou supérieure à 58 %.

- spermocytogramme : l'analyse morphologique de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle.

### 3. Le bilan hormonal

Dans le cas de l'infertilité masculine les hormones dosées sont : la testostérone, LH et FSH. Dans notre étude, les taux considérés comme normaux par la technique immunoenzymatique ; sont ceux préconisées par le fabricant des Kits « Vidas BioMérieux France », sont reportés en (**Tableau 3**) :

**Tableau 3** : taux normaux des hormones : Testostérone, FSH, LH.

Hormone	Norme pour adulte de 20-45 ans
FSH	1,7-12 UI/L
LH	1,1-7,0 UI/L
Testostérone	10-30 nmol/L

### 4. Le caryotype

Examen génétique effectué pour connaître la formule chromosomique. Chez un homme normal il est avec formule 46, XY (**Figure 10**). Alors qu'il peut être révélateur de remaniements chromosomiques évocateurs d'une infertilité.



**Figure 10** : Caryotype en bande R (Dimassi, et al., 2017).

## **5. La recherche des microdélétions du chromosome Y**

Afin de compléter le diagnostic de l'infertilité masculine on a recours à la recherche des microdélétions du chromosome Y. En effet, un simple caryotype en bande n'est pas capable de révéler une microdélétion à cause de la taille de résolution de la technique > 10 Mb. Dans ce cas nous procédons par PCR, à la recherche des Sequence-Tagged Sites (STS) spécifiques aux régions AZF. Les STS sont des courts fragments d'une séquence génomique, répartis dans les trois loci de la région AZF pour l'AZFa : sY84, sY86 pour l'AZFb : sY127, sY134 pour l'AZFc : sY254, sY255. L'absence d'une amplification par PCR de l'un des STS, indique la microdélétion dans le locus AZF correspondant (Simoni, et al., 1999; Perrin, 2009). La conséquence des microdélétions dépend des recombinaisons allant d'une oligozoospermie sévère à une azoospermie totale (**Tableau 2**) (PauloNavarro-Costa, 2012).

## **L'objectif du travail**

Dans ce travail nous avons voulu mettre en place un protocole simple et rapide pour l'analyse de la microdélétion du chromosome Y par les outils de la biologie moléculaire, en particulier par la PCR. Pour y arriver nous avons optimisé notre propre protocole en prenant comme modèle initial celui décrit par (Simoni, et al., 1999). Dans cette perspective nous avons testé plusieurs conditions expérimentales : l'origine de l'ADN génomique de nos patients (ADN lymphocytaire et ADN spermatique), le type de TAQ polymérase utilisée (3 Taq différentes), la température d'hybridation optimale (51°C à 57°C) de nos amorces.

Notre souhait est de proposer ce protocole de diagnostic pour son utilisation quotidienne dans la pratique médicale nationale.

---

*Partie pratique*

---

## **Introduction**

Les 3 conditions clés testées, pour réussir une réaction de PCR nous devons respecter de quelques conditions importantes : La qualité de l'ADN utilisé et sa concentration, le type d'Enzyme, sa fidélité et son efficacité et enfin les conditions d'amplifications de la cible.

### **A. L'origine de l'ADN**

L'origine de l'ADN et le protocole d'extraction de ce dernier sont optimisés dans l'objectif d'avoir le meilleur rendement en ADN extrait et le plus propre possible. Nous avons utilisé 2 tissus différents : un ADN sanguin frais ou congelé et un ADN spermatique, les 2 ADN sont extraits selon le même protocole (voir plus loin).

### **B. Température d'hybridation**

La qualité d'une PCR est liée à l'optimisation de la température d'hybridation des amorces. Quatre températures d'hybridation différentes sont testées pour chaque couple de STS utilisé : 51°C, 54°C, 55°C et 57°C.

### **C. L'enzyme utilisée**

Il existe sur le marché, plusieurs qualités de TAQ : La GENEON Maximo Taq DNA Polymerase, la Taq DNA Polymérase NEWENGLAND BioLabs UK et la GENEON H-S Plus-Taq DNA Polymerase (**Tableaux 5 et 6**). Nous avons choisi 3 Taq différentes afin de mieux réussir la réaction et pouvoir estimer le coût de la réaction de PCR global.

---

## *Matériel & Méthode*

---

## **1. Lieu et Période de l'étude**

Notre étude s'est étalée de début février à juillet 2019, dans la clinique IBN Roched Centre de Chirurgie et Sciences de la Reproduction à Boussof à Constantine en Algérie.

## **2. Population**

Les sujets sont des hommes adultes (20 sujets) ; tous des patients de la clinique IBN Rochd souffrant d'une infertilité primaire et venus dans le cadre d'une prise en charge en Procréation Médicalement Assistée (PMA). L'âge moyen des patients est de  $40 \pm 5$  ans.

## **3. Le choix des patients**

### **3.1 Lecture du dossier médical**

Aucun de nos patients n'a subi d'acte chirurgical ou des traumatismes touchant l'appareil génital, ni présentant de malformations qui peuvent entraîner une infertilité. De plus tous présentaient un bilan hormonal dans les taux considérés normaux. Aucun cas d'azoospermie obstructive n'est observé dans notre cohorte.

### **3.2 Spermogramme**

Un spermogramme est effectué par le laboratoire de spermiologie de la clinique IBN Rochd pour chaque individu. Les conditions suivies pour la réalisation de test sont celles dictées par l'OMS 2010.

### **3.3 Bilan hormonal**

Le bilan hormonal est fait par le laboratoire de la clinique, par le dosage du taux de FSH, LH et Testostérone par la technique immunoenzymatique; selon les conditions du fabricant Vidas BioMérieux France.

### **3.4 Le caryotype**

Le caryotype constitutionnel sur un prélèvement sanguin, tube lithium hépariné.

#### **3.4.1 Prélèvement**

Le prélèvement consiste en une prise de sang veineux dans un tube contenant un anticoagulant (l'héparine de lithium). La quantité de sang nécessaire est de 2 à 5ml.

### **3.4.2 Culture Lymphocytaires**

Les lymphocytes sont cultivés dans un milieu de culture stérile en présence de Phytohématoagglutinine forme M (*GIBCO*) pour induire leur prolifération mitotique (agent mitogène). La culture cellulaire se fait en respectant des conditions précises de température et de stérilité (sous hotte). Le milieu de culture utilisé est le RPMI 1640, complété par des nutriments et des additifs nécessaires pour la croissance cellulaire, comme : le sérum de veau fœtal à 5%, les antibiotiques à 100 µg/mL, LGlutamine (Acide aminé) à 2%. Le sang est mis en culture dans une étuve à 37°C pendant 72 heures.

### **3.4.3 Obtention des métaphases**

Blocage des cellules en métaphase (incubation avec la Colchicine 10 µg/ml -*GIBCO*-). Après 70h de culture, les lymphocytes activés sont bloqués en métaphase par l'ajout de 100 µl de colchicine pendant 2 heures à 37°C.

### **3.4.4 Choc hypotonique**

Après l'incubation centrifuger le tube pendant 7 minutes à 2000 tours/ min. Jeter le surnageant et rajouter 7ml de la solution hypotonique de KCl à 50 mM (préchauffée à 37°C à l'étuve) pendant 20 mn à 37°C.

### **3.4.5 Préfixation**

Après les 20 min, rajouter 2 ml de fixateur préparé une heure avant (1 volume d'acide acétique glacial pour 3 volumes de méthanol). Préparer 20 ml de fixateur par tube de culture. Centrifuger 7 minutes à 2000 tours/ min.

### **3.4.6 Fixation**

Après, jeter le surnageant, ajouter 7ml de fixateur et homogénéiser par vortex, répéter cette étape 2 à 3 fois. Laisser au moins 20 min à - 20 °C entre chaque étape.

Les suspension chromosomiques sont ainsi prêtes à l'étalement ou à une conservation à -20°C.

### **3.4.7 Etalement**

Déposer la lame au-dessus du bain marie (température du bain marie entre 65°C et 80 °C), avec une micropipette laissez tomber des gouttes de la suspension chromosomique obtenue, laisser la lame sur bain marie 2 mn puis faire l'observation par microscope optique

(en contraste de phase). Cette étape sert à vérifier l'indice mitotique (nombre de métaphases obtenues dans un champ d'observation).

### **3.4.8 Marquage chromosomique**

Le marquage se fait par banding R, pour obtenir le marquage chromosomique, il faut suivre le protocole suivant :

Laisser les lames étalées pour le caryotype constitutionnel une nuit dans l'étuve à 37°C pour le vieillissement. Faire sortir les lames et les laisser 5 mn dans de l'eau distillé. Traiter les lames dans le milieu physiologique Earl (Sigma, USA) pendant 47 min à 88°C pour le banding R. A la fin du traitement rincer les lames avec de l'eau distillée. Colorer au Giemsa à 1% pendant 3 min. Les étalements métaphasiques ont été observés par un microscope trioculaire connecté à un ordinateur équipé d'un logiciel d'analyse chromosomique. Le classement des chromosomes se fait sous une station Genicon avec système d'analyse d'images.

## **4. Mise au point du protocole expérimental**

### **4.1 Extraction de l'ADN**

Pour apprécier la meilleure qualité de l'ADN, nous avons travaillé sur 2 tissus : sur sang total et sur du sperme pour les individus avec oligozoospermie ou cryptozoospermie. Procéder sur l'ADN spermatique permet d'éviter à certains patients un double prélèvement et surtout obtenir rapidement un matériel riche en cellules.

#### **- Principe**

Le sang des patients est prélevé (5 ml) sur un tube (EDTA), par ponction veineuse.

Pour le sperme, après le spermogramme on récupère 1 ml de sperme pour les individus oligozoospermie et cryptozoospermie.

Pour le sang : Mélanger 2ml de Phosphate-Buffered Saline (PBS) avec 2ml de sang (frais ou après décongélation).

Pour le sperme : Mélanger 1ml de PBS avec 1ml de sperme.

Ajouter 100 µl de protéinase K (PK) (*SIUKA* à 10000µg/ml) pour le sang et 200µl pour le sperme, agiter par le vortex et l'incuber une nuit à 37°C.

Après l'action de la PK, nous procédons à une séparation des éléments protéiques et de l'ADN avec la technique phénol / chloroforme :

Ajouter le même volume phénol, laisser agir pendant 10 min en agitant de temps en temps. Centrifuger 15 mn à 4000 tour/minute. A la fin de la centrifugation vous obtenez 2 phases.

A l'aide d'une pipette pasteur récupérer le surnageant (phase aqueuse) et ajouter le même volume de chloroforme. Agiter pendant 5 min puis centrifuger 15 mn à 4000 tour/minute. A la fin de la centrifugation vous obtenez 2 phases.

A l'aide d'une pipette pasteur récupérer le surnageant (phase aqueuse) et ajouter 10% de la solution de NaCl à 4M, après ajouter 2 volumes et demi d'alcool (éthanol) à 100 % froid à (-20°C) pour faire précipiter l'ADN.

Récupérer l'ADN flottant (méduse) avec une pipette pasteur et la mettre dans l'eau distillée stérile pour lavage de l'ADN.

## **4.2 Dosage de l'ADN**

La concentration d'ADN est déterminée par une mesure de spectrophotomètre.

L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A260/A280 est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8 à 2.

La concentration est déterminée selon la formule suivante

$[ADN]=A_{260} \times 50 \times \text{facteur de dilution}$  (dans notre cas il est de 10%)

Dont A260 est le résultat du dosage à 260nm ;

Dilution = 100 µl dans 900 µl eau distillée, Facteur de dilution = 10

50ng ADN pour 1 densité optique (DO).

## **4.3 Lancement de la PCR**

Le Thermocycleur utilisé est un Thermo Scientific Hybaid, avec un socle à 96 puits pour tubes à 200 µl.

### **4.3.1 Réactifs utilisés pour la PCR**

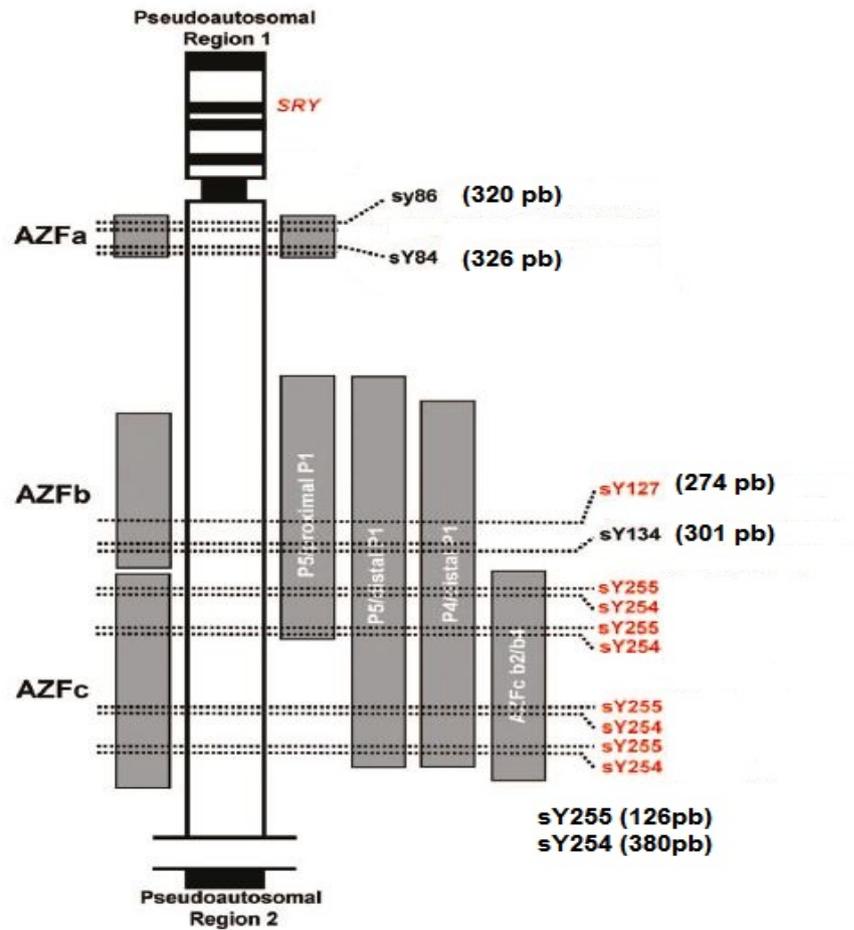
1 ADN : L'ADN utilisé dans chaque réaction varie selon l'individu et l'origine de tissu d'extraction.

2 DésoxyNucléotides Triphosphates (DNTP) : composé dATP, dTTP, dGTP, dCTP, elles constituent l'élément de bases pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires par la Taq polymérase, La concentration primaire des dNTP utilisé est de 2mM.

3 Enzyme : trois Taq polymérase enzymes sont utilisées, ces enzymes sont extraites de la bactérie *Thermophilus aquaticus*. Chaque enzyme possède son propre tampon de réaction fourni avec le KIT. Elles sont toutes utilisées dans les conditions décrites par le fabricant à une concentration de 5U/ $\mu$ l.

- a) Taq DNA Polymérase NEWENGLAND BioLabs UK.
- b) GENEON Maximo Taq DNA Polymerase.
- c) GENEON H-S Plus-Taq DNA Polymerase.

4 Les amorces : 7 couples d'amorces sont utilisés pour la recherche de microdélétions du chromosome Y, SRY, SY84, SY127, SY134, SY254, SY255 (**Figure 11**).



**Figure 11** : la localisation des amorces utilisées (STS) selon (Kozina, et al., 2011).

#### 4.3.2 Température d'hybridation

La température d'hybridation est calculée pour chaque nouvelle PCR en fonction de la séquence de l'amorce utilisée (**Tableau 4**). Nous avons pris en compte la séquence de cette amorce afin de calculer cette température en utilisant la formule classique suivante :

$$T_h = T_m - 5^\circ\text{C}$$

Dont :  $T_h$  : la température d'hybridation ;  $T_m$  : la température de demi-dénaturation.

La  $T_m$  des amorces inférieur à 30 nucléotides est calculée comme suivant :

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

(Où A, T, G et C, le nombre de chacune de ces bases dans l'amorce (Benlot-Larcher, et al., s.d.).

**Tableau 4** : les amorces utilisées dans notre étude.

Amorce	Taille (PB)	Localisation	Locus	Séquence, 5' to 3'	Température d'hybridation calculée
SY84	326	AZF A	DYS273	F AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT	55°
				R GCCTACTACCTGGAGGCTTC	
SY86	320	AZF A	DYS148	F GTGACACACAGACTATGCTTC	57°
				R ACACACAGAGGGACAACCCT	
SY127	274	AZF B	DYS218	F GGCTCACAAACGAAAAGAAA	51°
				R CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	
SY134	301	AZF B	DYS224	F GTCTGCCTCACCATAAAACG	51°
				R ACCACTGCCAAAACCTTTCAA	
SY254	380	AZF C	DAZ	F GGGTGTACCAGAAGGCAAA	55°
				R GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	
SY255	126	AZF C	DAZ	F GTTACAGGATTCGGCGTGAT	53°
				R CTCGTCATGTGCAGCCAC	
SY14	472	-	SRY	F GAATATCCCGCTCTCCGGA	57°
				R GCTGGTGCTCCATTCTTGAG	

F : Forward (direct), R : Revers (complémentaire).

#### 4.3.3 Protocole de PCR :

Nous avons suivi les indications du fabricant pour ce qui concerne l'utilisation des enzymes Taq. Les conditions sont résumées en (**Tableaux 5, 6 et 7**). Chacune des enzymes est utilisée pour obtenir une amplification d'un fragment d'ADN d'une taille connue.

**Tableau 5** : protocole de PCR pour la Taq polymérase NEWENGLAND BioLabs UK.

Composants	Réaction de 50 $\mu$ l	Concentration final
10X Standard Taq Reaction Buffer	5 $\mu$ l	1X
10 mM dNTPs	1 $\mu$ l	200 $\mu$ M
Amorce 10 $\mu$ M Forward	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M (0.05–1 $\mu$ M)
Amorce 10 $\mu$ M Reverse	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M (0.05–1 $\mu$ M)
ADN	Variable	<1,000 ng
Taq Polymérase	0.25 $\mu$ l	1.25 Unités/50 $\mu$ l PCR
Eau stérile	Jusqu'à 50 $\mu$ l	

**Tableau 6** : Protocole de PCR pour la GENEON Maximo Taq DNA Polymerase et la GENEON H-S Plus-Taq DNA Polymerase.

Composants	Volume par réaction
10X reaction buffer	5-10 $\mu$ l
100 mM MgCl <sub>2</sub>	Optionnel
dNTP-Mix (40mM)	1.0 $\mu$ l
Amorce 10 $\mu$ M Forward	0,5-2.5 $\mu$ l
Amorce 10 $\mu$ M Reverse	0.5-2,5 $\mu$ l
ADN	1-10 $\mu$ g/ml ADN génomique
Maximo H-S Plus Taq DNA (5 u/ $\mu$ l)	0.2 - 1.0 $\mu$ l
Eau stérile	Jusqu'à 50 $\mu$ l

#### 4.3.4 Les phases de réaction de PCR

Le protocole d'amplification conçu pour toutes les réactions de PCR (**Tableau 7**)

**Tableau 7** : Protocole général de Thermocycleur.

Phase	Température	Temps
Dénaturation initiale des 2 brins d'ADN.	95°C	5 minutes
Hybridation : Les amorces s'hybrident chacune sur leur brin d'ADN cible grâce à l'appariement des bases complémentaires. 35 Cycles	95°C	15-30 seconds
	47°C - 68°C	1 minute
Elongation finale : la Taq polymérase combine les nucléotides avec amorces hybridées	68°C	5 minutes
Hold	4°C	

#### **4.3.5 Contrôle des produits de PCR**

Un gel d'agarose à 2% est préparé afin de contrôler les produits d'amplification (2g d'agarose dans 100 ml du TBE (Tris Borate, EDTA) à un 1X plus 2 $\mu$ l de BET (bromure d'Ethidium)), après fusion et refroidissement du mélange, il est coulé sur un plateau avec un peigne de 14 puits. Une fois solidifié le gel est immergé dans la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE 1X.

- Le dépôt des produits d'amplification

Quinze microlitres du produit de PCR sont mélangés avec 5  $\mu$ l de tampon de charge Bleu de bromo-phénol (concentré 6 fois).

Le BET est un agent intercalant entre les bases nucléiques et il rend l'ADN fluorescent quand il est exposé aux Ultraviolets (UV).

Un marqueur de taille de 100-1000 pb est co-migré avec les produits d'amplification pour définir la taille des différents fragments.

La migration des amplicons est faite sous une tension 130 V pendant 30 minutes.

Après la migration du gel, il est observé sous UV. Les produits d'amplification apparaissent fluorescents et des photos sont prises par le système d'analyse d'images.

#### **4.4 Les mises au point**

Un premier test de PCR a été lancé dans les conditions standards ; à savoir les conditions décrites par (Simoni, et al., 1999). Chaque Taq a été utilisée dans les conditions standards décrites par le fabricant. En fonction des résultats préliminaires obtenus nous avons retenu pour la suite des optimisations, l'enzyme qui a donné la meilleure amplification. Nous avons aussi retenu les couples d'amorces des 3 STS localisés dans les régions AZF et leur température d'hybridation pour la réalisation de la PCR multiplexe.

---

## *Résultats & Discussion*

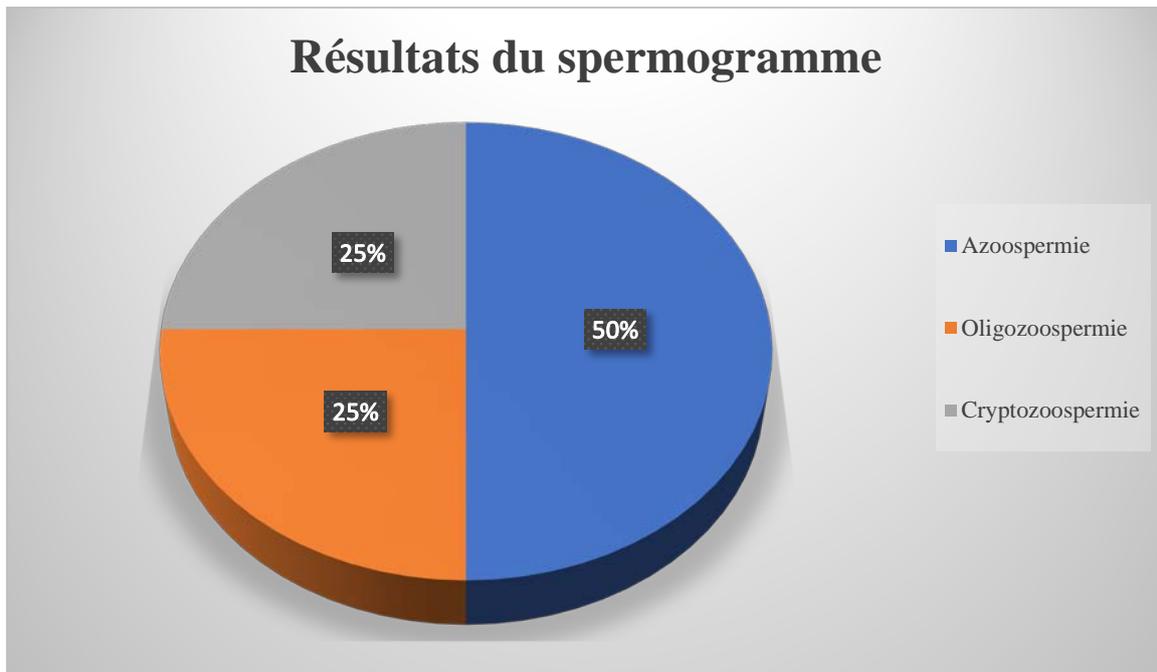
---

## 1. Spermogramme :

Nos 20 patients se répartissent comme suit : 10 atteints d'une azoospermie soit (50%), 5 d'une oligozoospermie soit (25%) et 5 d'une cryptozoospermie soit une prévalence de (25%) (Tableau 8).

**Tableau 8** : les résultats du spermogramme.

	Effectifs	Pourcentage %
Azoospermie	10	50
Oligozoospermie	5	25
Cryptozoospermie	5	25
Total	20	100

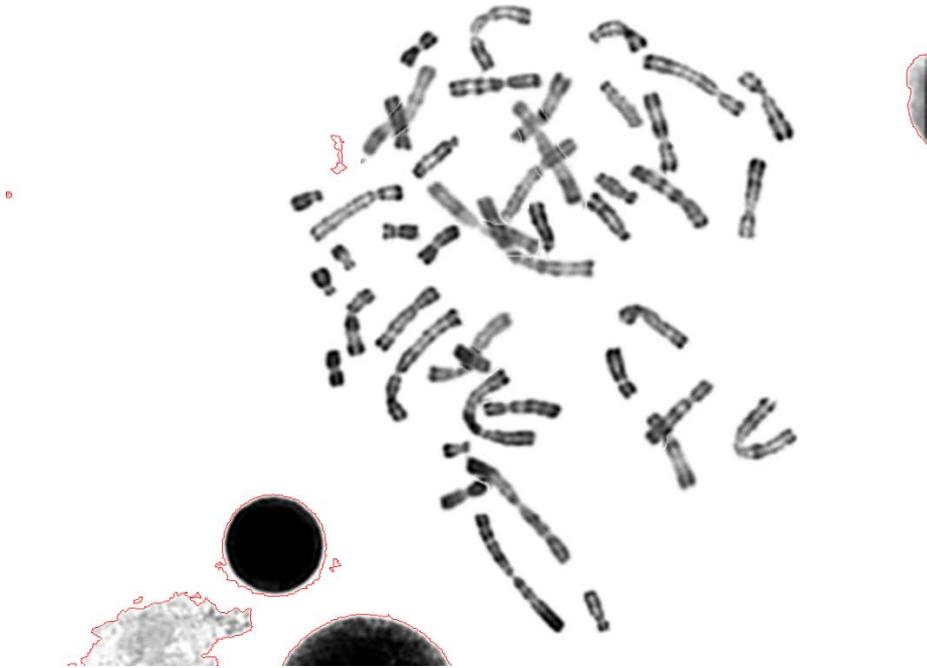


**Figure 12** : Pourcentage des résultats du spermogramme.

Nos résultats (Figure 12) sont similaires à ceux trouvés en Tunisie avec 65,5% des patients avec azoospermie, 19,5% avec oligozoospermie et 15% cryptozoospermie (Ghorbel, et al., 2014).

## 2. Caryotype

Les 20 patients sont avérés à caryotype masculin normal 46, XY (Figures 13 et 14). Ce qui élimine les cas présentant un remaniement chromosomique de type syndrome de Klinefelter ou présentant un remaniement chromosomique à l'origine de son infertilité.



**Figure 13** : Un caryotype non-réarrangé effectué sur un de nos patients.



**Figure 14** : le même caryotype après classement.

## 3. Bilan hormonal

Le bilan hormonal, de tous les patients : Testostérone, LH et FSH sont aux normes (Tableau 3).

## 4. Origine de l'ADN utilisé

### 4.1 Extraction de l'ADN et son dosage

Nous avons utilisé 2 ADN provenant de 2 tissus différents, afin de voir les meilleurs rendements (quantité et qualité) en ADN extrait (**Tableau 9**). Cette démarche est dictée par la difficulté de prélever certains patients (éloignement et contraintes professionnelles), nous sommes alors obligés de recourir à du tissu spermatique pour obtenir de l'ADN.

**Tableau 9** : La concentration des ADN par spectrophotométrie.

ADN	Tissus	Concentration ng / $\mu$ l
1	Sanguin	50
2	Sanguin	40
3	Sperme	97
4	Sanguin	43
5	Sperme	88
6	Sanguin	404
7	Sanguin	379
8	Sperme	425
9	Sanguin	394
10	Sperme	55
11	Sperme	36
12	Sanguin	42
13	Sperme	81
14	Sanguin	46
15	Sperme	19
16	Sperme	31
17	Sanguin	30
18	Sanguin	14
19	Sperme	60
20	Sperme	67
Témoin 1	Sperme	100
Témoin 2	Sanguin	6

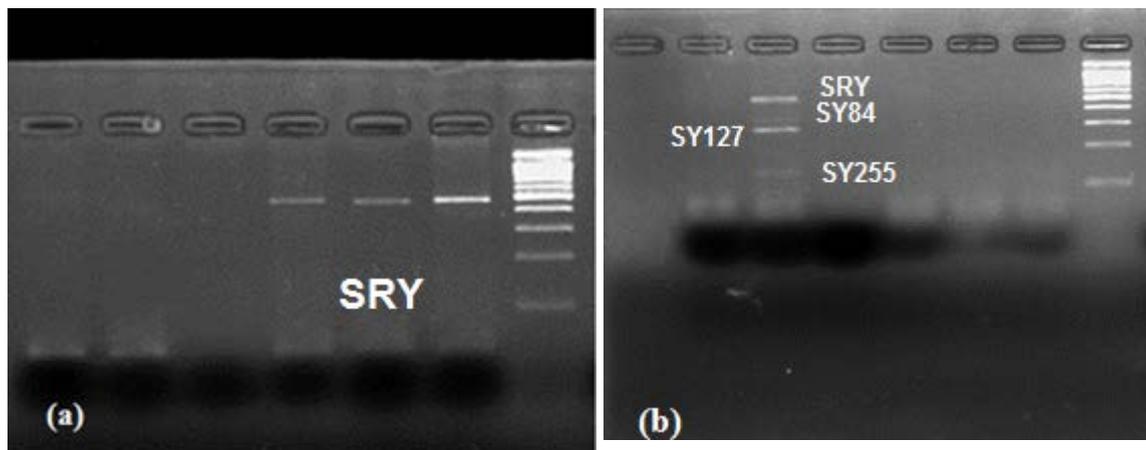
L'origine de l'ADN ne semble pas influencer les résultats pour ce qui concerne les rendements en concentrations d'ADN. En effet, nous avons obtenus des quantités d'ADN équivalentes avec les 2 tissus utilisés (**Tableau 9**). Pour ce qui concerne une éventuelle influence des résultats de la PCR en fonction de la pureté des ADN utilisés, nous avons obtenues des résultats positifs et négatifs, avec l'un ou l'autre des ADN. Il n'y a donc pas de biais sur le résultat en fonction de l'origine de l'ADN ; ce qui a été déjà observé (Darbandi, et al., 2018).

## 5. Résultat de l'analyse moléculaire

### 5.1 Les enzymes

#### 5.1.1 Les résultats des PCR selon l'enzyme utilisée :

Les résultats du test préliminaire de la PCR montrent que seule la Taq DNA Polymérase NEWENGLAND BioLabs UK a donné satisfaction pour SRY (**Figure 15 a**) et pour les 3 amorces AZF avec une seule amplification positive (**Figure 15 b**).



**Figure 15 :** Amplification par l'enzyme NEWENGLAND BioLabs. Une bande unique relative à l'amplification de SRY a été obtenue avec les 3 enzymes (**Figure 15a**). Les résultats de l'amplification du locus AZF avec les 3 enzymes, montrent le seul résultat positif est obtenu avec NEWENGLAND BioLabs (**Figure 15b**).

Les résultats préliminaires obtenus avec la Taq DNA Polymérase NEWENGLAND BioLabs UK, nous réconfortent dans notre démarche pour optimiser les autres conditions de PCR (**Tableau 10**).

Nous avons alors mis au point les autres conditions du protocole final de température d'hybridation et de la spécificité du signal de PCR.

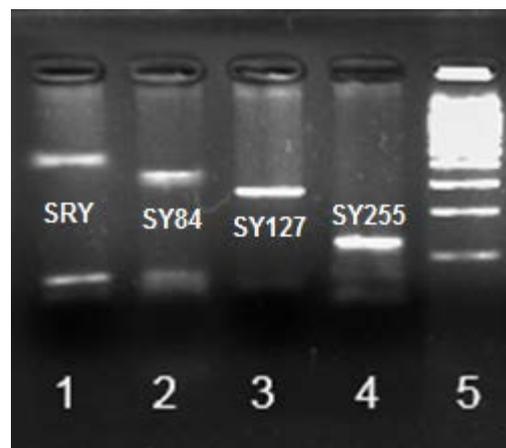
**Tableau 10** : résultats des PCR selon l'enzyme utilisée.

Région	Amorces	Maximo	BioLabs	HS plus
		Résultat	Résultat	Résultat
AZFa	SY84	+	+	-
	SY86	-	+	-
AZFb	SY127	-	+	-
	SY134	-	+	-
AZFc	SY254	-	+	-
	SY255	-	+	-
SRY	SY14	+	+	(+)*

(\*) le signal est relativement faible par rapport aux 2 autres signaux obtenus avec la Taq Maximo et Biolabs.

## 5.2 Les conditions de température d'hybridation :

Quatre PCR sont réalisées pour chaque patient et pour chaque température, avec les 4 amorces : SRY, SY84, SY127 et SY255 (**Tableau 4**). Nous avons retenu ces conditions, car elles sont décrites dans diverses publications (Aknin-Seifer, et al., 2002; Dada, et al., 2003; Promega Corporation, 2018). Néanmoins, nous avons modifié la température d'hybridation pour chaque PCR, afin d'en choisir le plus discriminante (**Tableau 11**). Selon nos résultats, 2 températures semblent équivalentes, 54°C et 55°C, et donnent des résultats satisfaisants (**Figure 16**).



**Figure 16** : Amplification simplexe de l'ADN génomique. Les résultats de la mise au point de la température d'hybridation à 54°C. (1) SRY, (2) SY84 (AZFa), (3) SY127 (AZFb) et (4) SY255 (AZFc) et (5) marqueur de taille 100 pb.

**Tableau 11** : Résumé des résultats de l'amplification du locus AZF à différentes températures (51°C, 54°C, 55°C et 57°C).

Région	Température °C			
	51	54	55	57
AZFa	Positif	Positif	Positif	Négatif
AZFb	Négatif	Positif	Positif	Négatif
AZFc	Négatif	Positif	Positif	Négatif
SRY	Positif	Positif	Positif	Positif

En prenant en considération la température optimale d'hybridation de chaque amorce, la température de 54°C ou 55°C donne des résultats satisfaisants et reproductibles pour l'ensemble des amorces AZF en plus de SRY.

L'analyse du (**Tableau 11**), montre à titre d'exemple qu'à 51°C certaines amorces n'ont pas données de résultats positifs pour les STS : SY84, SY86 et SY254, alors qu'à 54°C la PCR a été positive pour ces mêmes amorces (**Figure 16**). Cela est probablement due au fait que les séquences amplifiées sont localisées dans des régions génomiques hautement répétées et riches en CG, ce qui rend leurs amplifications difficiles à température de 51°C (Simoni, et al., 2004). Le phénomène de réassociation rapide des séquences répétées pourrait être évité avec des températures d'hybridation plus élevées, raison pour laquelle nous avons obtenu des amplifications à 54°, 55°C et 57°C (**Tableau 4**).

### 5.3 Résultats des PCR pour l'ensemble des patients

Le (**Tableau 12**) résume l'ensemble des résultats obtenus après l'analyse de nos patients avec les 2 ADN témoins : un ADN normal et un ADN féminin.

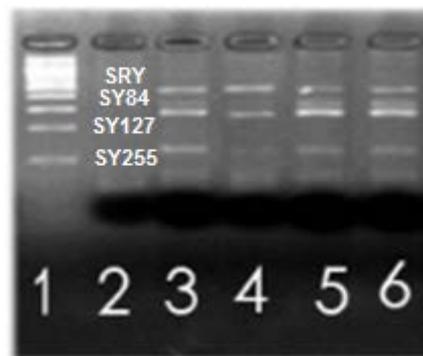
**Tableau 12** : les résultats de PCR obtenus pour notre échantillon. Les ADN sont amplifiés dans les même conditions en PCR simplexe à 54°C et avec la TaQ Biolabs.

Patient	AZFa		AZFb		AZFc		SRY
	SY84	SY86	SY127	SY134	SY254	SY255	SY14
ADN 1	+	+	+	+	+	+	+
ADN 2	+	+	+	+	+	+	+
ADN 3	+	+	+	+	+	+	+
ADN 4	+	+	+	+	+	+	+
ADN 5	+	+	+	+	+	+	+
ADN 6	+	+	+	+	+	+	+
ADN 7	+	+	+	+	+	+	+
ADN 8	+	+	+	+	+	+	+
ADN 9	+	+	+	+	+	+	+
ADN 10	+	+	+	+	+	+	+
ADN 11	+	+	+	+	+	+	+
ADN 12	+	+	+	+	+	+	+
ADN 13	+	+	+	+	+	+	+
ADN 14	+	+	+	+	+	+	+
ADN 15	+	+	+	+	+	+	+
ADN 16	+	+	+	+	+	+	+
ADN 17	+	+	+	+	+	+	+
ADN 18	+	+	+	+	+	+	+
ADN 19	+	+	+	+	+	+	+
ADN 20	+	+	+	+	+	+	+
ADN F	-	-	-	-	-	-	-
ADN N	+	+	+	+	+	+	+

Après analyse de nos résultats de PCR (**Tableau 12**), nous pouvons dire que les températures d'hybridation 54°C ou 55°C sont idéales pour l'amplification des STS spécifiques aux locus AZF (spécificité et rendement). En effet l'ADN féminin témoin n'a pas donné un résultat positif pour les STS correspondant aux locus AZF et SRY, puisque, le génome féminin est dépourvu du chromosome Y. De même la présence des amplifications des STS correspondants aux locus AZF et SRY pour un génome masculin fertile apparaît évidente. A des températures plus élevées 55°C et 57°C, les résultats ne sont pas homogènes. Si à 55°C, nous n'avons pas constaté de différences avec 54°C, les ADN amplifiés, à 57°C certaines PCR étaient négatives ou présentaient de faibles rendements d'amplification.

En effet, une température de 54°C ou 55°C est proche de la température déjà décrite pour l'amplification de ces 4 STS (Aknin-Seifer, et al., 2002; Dada, et al., 2003; Promega Corporation, 2018).

Il est évident que nos conditions sont pour une PCR simplexe, mais nos premiers tests en PCR multiplexe (**Figure 17**) à 54°C donnent des résultats satisfaisants, en effet, les signaux d'amplifications des STS sont positifs, même s'ils ne sont pas reproductibles d'un ADN à un autre.



**Figure 17 :** Amplification multiplexe des régions AZF et SRY. Les résultats de la mise au point de la PCR multiplexe à 54°C. (2) ADN féminin, (3) ADN patient 1, (4) ADN patient 2, (5) ADN patient 3, (6) ADN patient 4, (1) marqueur de taille.

Pour ce qui concerne l'absence de cas de microdélétions de locus AZF chez nos patients, cela est certainement en lien avec le faible effectif de notre échantillon. Ce résultat est attendu, la littérature scientifique sur ce sujet note le faible pourcentage d'individus porteurs de microdélétions dans la population d'hommes infertiles (moins de 7%) (Stahl, et al., 2010).

---

## *Conclusion & Perspective*

---

## **Performance du test de diagnostic moléculaire**

Le diagnostic moléculaire de pathologies humaines reste un moyen efficace et robuste pour éclairer la médecine moderne et leur prise en charge. Nous nous sommes alors intéressé au diagnostic de l'infertilité masculine, problème de santé majeur, vu les multiples facteurs agissants dessus : génétique, environnementaux, mode de vie.....

Nous avons alors optimisé un protocole de PCR multiplexe qui pourrait être facilement transposable aux conditions nationales. Les résultats que nous avons obtenus sont certes hétérogènes, ils sont probablement influencés par la qualité de l'ADN utilisé et par sa concentration. En effet, la concentration minimale qu'il faudrait utilisée pour nos réactions serait autour de 70 ng d'ADN par réaction. La technique d'extraction au phénol/chloroforme ne semble pas adéquate pour notre protocole, vu ses rendements faibles en ADN et la présence de restes protéiques dans nos ADN qui est aussi un facteur limitant. Il faut peut-être utiliser d'autre Kit d'extraction d'ADN, même si cela risque d'augmenter le coût final du test.

Pour l'enzyme, l'enzyme Taq BioLabs semble donner les meilleurs résultats vu son rendement élevé et ses conditions d'utilisation. Cette enzyme à une température de synthèse à 68°C, au lieu de 72°C, ce qui réduit le temps de réaction global de la PCR. Elle est décrite pour la première fois dans un protocole de PCR multiplexe à la recherche de microdélétions du chromosome Y et par conséquent nous n'avons pas de résultats comparatifs concernant ses performances.

Nos résultats préliminaires concernant les conditions de la PCR multiplexe nous encouragent à continuer nos essais afin d'optimiser le protocole, mais nous pouvons dire que notre objectif premier a été atteint ; la mise au point un protocole de PCR pour identifier les éventuelles microdélétions du chromosome Y chez des patients infertiles.

---

*Références Bibliographique*

---

1. Akinin-Seifer, I. et al., 2002. Évaluation d'une technique simple et rapide de détection de microdélétions du bras long du chromosome Y. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, pp. 34-41.
2. Auger, J., 2018. Spermatozoa and Sperm Structure. *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*, pp. 62-67.
3. Azenabor, A., Ekun, A. O. & Akinloye, O., 2015. Impact of Inflammation on Male Reproductive Tract. *Journal of Reproduction & Infertility*, pp. 123-129.
4. Ben Khelifa, M., 2014. *Identification et caractérisation de gènes impliqués dans l'infertilité masculine*, Grenoble: Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble.
5. Benlot-Larcher, C. et al., s.d. *PCR: optimisation de la réaction PCR*; Sorbonne-Université Sciences.. [En ligne] Available at: [https://rnbio.upmc.fr/bio-mol\\_pcr2](https://rnbio.upmc.fr/bio-mol_pcr2) [Accès le 29 5 2019].
6. Bojesen, A., Juul, S. & Gravholt, C. H., 2003. Prenatal and Postnatal Prevalence of Klinefelter Syndrome: A National Registry Study. *the journal of clinical endocrinology & metabolism*, pp. 622-626.
7. Borghot, M. V. & Wyns, C., 2018. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*, pp. 2-10.
8. Butler, J. M., 2012. Chapter 13 - Y-Chromosome DNA Testing. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, pp. 371-403.
9. Chaîne, C., 2019. *Syndrome de Klinefelter : symptômes, traitement, définition*. [En ligne] Available at: <https://www.docteurlic.com/maladie/syndrome-de-klinefelter.aspx> [Accès le 02 07 2019].
10. Cram, D., Osborne, E. & McLachlan, R., 2006. Y chromosome microdeletions: implications for assisted conception.. *The Medical Journal of Australia*, pp. 433-4.
11. Dada, R., Gupta, N. P. & KucherIA, K., 2003. Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligozoospermia and azoospermia. *Journal of Biosciences*, pp. 163-168.
12. Darbandi, M. et al., 2018. A simple, rapid and economic manual method for human sperm DNA extraction in genetic and epigenetic studies. *Middle East Fertility Society Journal*, pp. 216-219.
13. De Kretser, D. M., Loveland, K. & O'Bryan, M., 2016. Chapter 136 - Spermatogenesis. *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*, pp. 2325-2353.
14. Dimassi, S., M.Tilla & D.Sanlavill, 2017. Anomalies chromosomiques. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* , pp. 249-270.
15. Eduardo, C., Bacallao, K. & al, e., 2013. Androgen Receptor Gene CAG and GGN Repeat Polymorphisms in Chilean Men With Primary Severe Spermatogenic Failure. *journal of andrology*, pp. 552-559.
16. El Moussaif, N., Haddad, N. E., N.Iraqi & A.Gaouzi, 2011. 45,X/46,XY mosaicism: Report of five cases and clinical review. *Annales d'Endocrinologie*, pp. 239-243.
17. Faure, A.-K., 2007. *Exploration du génome et de l'épigénome dans les troubles sévères de la spermatogénèse chez l'homme*, Grenoble: Université Joseph Fourier, Grenoble I.

18. Frydman, R., 2016. *Infertilité Prise en charge globale et thérapeutique*. s.l.:Elsevier Masson.
19. Genecards, s.d. *GSTM1 Gene*. [En ligne] Available at: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSTM1&keywords=gstm1> [Accès le 22 06 2019].
20. Ghorbel, M. et al., 2014. Deletion of CDY1b copy of Y chromosome CDY1 gene is a risk factor of male infertility in Tunisian men. *Gene*, pp. 251-255.
21. Guérin, J.-F., 2016. Chapitre 8 - La spermatogénèse. *Infertilité*, pp. 59-64.
22. Guichaoua, M. R. et al., 2009. Aspects génétiques de la tératozoospermie Genetic aspects of the teratozoospermia. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, pp. 540-545.
23. Hadziselimovic, r., Genetol, f. & r.Emmons, 1998. increased apoptosis in the contralateral testes of patients with testicular torsion as a factor for infertility. *The Journal of Urology*, pp. 1158-1160.
24. Hammoud, S. S. et al., 2010. Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertility and Sterility*, pp. 1728-1733.
25. Jarow, J., 2003. Endocrine causes of male infertility.. *The Urologic Clinics of North America*, pp. 83-90.
26. Kent-First, M. et al., 1996. The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their infertile fathers. *Molecular Human Reproduction*, pp. 943-950.
27. Kerem, B. et al., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, pp. 1073-1080.
28. Kozina, V., Cappallo-Obermann, H., Gromoll, J. & AN., S., 2011. A one-step real-time multiplex PCR for screening Y-chromosomal microdeletions without downstream amplicon size analysis.. *PLOS One*, pp. 1-10.
29. Krahn, T., 2006. *Symbolic map of the Yq11 palindromic region*. s.l.: s.n.
30. Krausz, C., 2011. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, pp. 271-285.
31. Krausz, C. & Cioppi, F., 2019. Genetics of Male Infertility. *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)*, pp. 821-830.
32. Lahn, B. T. et al., 2002. Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 8707-8712.
33. Lorusso, F. et al., 2010. Impact of chronic viral diseases on semen parameters. *first international journal of andrology andrologia*, pp. 121-126.
34. Madan, K., 1983. Balanced structural changes involving the human X: Effect on sexual phenotype. *Human Genetics*, pp. 216-221.
35. Matzuk, M. & DJ., L., 2008. The biology of infertility: research advances and clinical challenges.. *nature medicine*, pp. 1197-1213.

36. May-Panloup, P., Malinge, M., Larget-Piet, L. & Chrétien, M., 2009. Genetic male infertility and assisted reproductive technology (ART).. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, pp. 583-593.
37. McElreavey, K., Krausz, C. & C. Patrat, M. F., 2002. Infertilité masculine et les microdélétions du chromosome Y,. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*,, 30(5), pp. 405-412.
38. Meirow, D. & Schenker, J., 1995. Infertility: Cancer and male infertility. *Human Reproduction*, p. 2017–2022.
39. Merck, 2013. *L'infertilité chez l'homme: causes possibles*. [En ligne] Available at: <http://www.fertility.ch/fr/Infertilite-masculine.htm> [Accès le 27 2019].
40. Nicopoullos, J. D., Almeida, P. A., Ramsay, J. W. & Gilling-Smith, C., 2004. The effect of human immunodeficiency virus on sperm parameters and the outcome of intrauterine insemination following sperm washing. *Human Reproduction*, pp. 2289-2297.
41. O'Bryan, M. K. & et al, 2008. Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility. *Developmental Biology*, pp. 359-370.
42. OMS, W. H. O. D. o. R. H. a. R., 2010. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5e éd. s.l.:s.n.
43. Patrat, C. et al., 2010. Clinical data and parenthood of 63 infertile and Y-microdeleted men. *Fertility and Sterility*, pp. 822-832.
44. PauloNavarro-Costa, 2012. Sex, rebellion and decadence: The scandalous evolutionary history of the human Y chromosome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, pp. 1851-1863.
45. Perrin, A., 2009. *Analyse de l'équipement chromosomique et de la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes d'hommes infertiles*, Brest: Faculte de medecine et des sciences de la sante de Brest.
46. Peterlin, B., Zorn, B., M.Volk & T.Kunej, 2006. Association between the apolipoprotein B signal peptide gene insertion/deletion polymorphism and male infertility. *Molecular Human Reproduction*, pp. 777-779.
47. Plessis, S. S. D. et al., 2010. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nature Reviews Urology*, pp. 153-161.
48. Promega Corporation, 2018. *Y Chromosome Deletion Detection System, Version 2.0*. madison, Wisconsin : s.n.
49. Ravel, C., S, C.-B., Ken, M. & Siffroi, J.-P., 2006. Polymorphismes du chromosome Y et fertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* , pp. 885-893.
50. Reynolds, N. & Howard, J. C., 2005. Role of the DAZ genes in male fertility. *Reproductive BioMedicine Online* , pp. 72-80.
51. Rodríguez, C. S., Gónima, P. C., Cardoso, J. V. G. & Carmen González Enguita, 2018. Infectious and Inflammatory Male Infertility,. *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*,, pp. 291-296.

52. Schiebel, K. et al., 1997. Abnormal XY Interchange between a Novel Isolated Protein Kinase Gene, PRKY, and Its Homologue, PRKX, Accounts for One Third of All (Y+)XX Males and (Y-)XY Females. *Human Molecular Genetics*, p. 1985–1989.
53. Shier, D., Butler, J. & Lewis, R., 2011. *Hole's eleventh edition essentials of Human Anatomy Physiology*. New York: McGraw-Hill.
54. Simoni, M. et al., 1999. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *International Journal of Andrology*, pp. 292-9.
55. Simoni, M., Bakker, E. & Krausz, C., 2004. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *international journal of andrology*, pp. 240-249.
56. Skaletsky, H. & al, e., 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, p. 825–837.
57. Stahl, P. et al., 2010. A decade of experience emphasizes that testing for Y microdeletions is essential in American men with azoospermia and severe oligozoospermia.. *Fertility and sterility*, p. 1753–1756.
58. Thonneau, P. et al., 1991. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989).. *Human Reproduction*, pp. 811-6.
59. Tiepolo, L. & Zuffardi, O., 1976. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human y chromosome long arm. *Human Genetics*, pp. 119-124.
60. Tyler-Smith, C., 2013. Y Chromosome (Human). *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, pp. 376-379.
61. Vogt, P. H., 2005. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*, pp. 81-93.
62. Zini, A. & Chokron, C., 2004. Fertility in Men with Spermatogenesis Abnormalities. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, pp. 52-57.

Année universitaire : 2018 - 2019

Présenté par : ZEGHICHI Mohamed Ragheb  
Aimene

**Titre**

**DIAGNOSTIC PAR PCR DES MICRODELETIONS DU CHROMOSOME Y DANS  
LE CADRE DE LA PRISE EN CHARGE DES INFERTILITES MASCULINES.**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique**

**التلخيص**

العقم، الذي يعرف بأنه عدم القدرة على الحمل بعد سنة من الجماع المنتظم دون موانع تظل مشكلة اجتماعية وثقافية هامة جدا. حوالي 15% من الأزواج لديهم صعوبة في الإنجاب. و نصف هذه الحالات مصدرها الرجل. ، عدة أسباب مسؤولة عن هذا العقم : أسباب منوية، كروموزومية او وراثية.

الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن الأسباب الوراثية المسؤولة عن العقم عند الرجال في الجزائر و وضع اجراءات روتينية , بسيطة و سريعة للتشخيص الجزيئي. التحاليل الجزيئية تمت بواسطة PCR multiplexe للبحث في منطقة AZF للصبغي Y.

20 رجل مصابون بالعقم كانوا محل الدراسة. أجريت تحاليل النمط النووي للدم لكافة المصابين باستخدام معيار النطاقات R ، بالنسبة لتقنية PCR تم استخدام 6 أنواع من البرايمر للكشف عن AZF microdélétions.

كل المرضى المختارون لهذه الدراسة لديهم نمط نووي عادي XY , 46 ، بالنسبة لـ les microdélétions للصبغي Y النتائج الجزيئية أظهرت عدم وجود microdeletions عند هؤلاء المصابين بالعقم.

نتائج البحث بينت أن التحاليل الوراثية باستعمال النمط الوراثي وتقنية PCR multiplexe ضرورية للتكفل الفعال بالعقم عند الرجال في الجزائر.

Mots clés : infertilité masculine, locus AZF, SRY, microdélétions du chromosome Y, PCR multiplexe.

**Laboratoires de recherche :**

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Président du jury :** SATTA Dalila (Pr - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Encadreur :** Mr. BENZAADA Mostefa (MCB - Université de Khenchela).

**Examineur :** REZGOUN Mohamed Larbi (MCA - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire : 2018 - 2019

Présenté par : ZEGHICHI Mohamed Ragheb  
Aimene

**Title**

**DIAGNOSTIC PAR PCR DES MICRODELETIONS DU CHROMOSOME Y DANS  
LE CADRE DE LA PRISE EN CHARGE DES INFERTILITES MASCULINES.**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique**

**Abstract**

Worldwide approximately 15 to 20 % of couples have difficulty to get babies. A half of the infertilities are caused by the male's sperm failure. New methods of investigation of spermatogenic, cytogenetics and/or genetics causes can be explained the origin of this infertility, and improved many couple's chances of having a baby. The aim of this study was to detect the frequency of microdeletions of Y chromosome in idiopathic cases of male infertility in Algerian population, and suggesting a simple and fast molecular diagnosis procedure.

The molecular investigation of the microdeletions affecting AZF locus was done by multiplex PCR. The karyotype patients with a normal karyotype 46, XY, were realized for the set of our patients by using the revers banding procedure (GRH). Microdeletion analysis was performed by multiplex polymerase chain reaction methods on DNA extracted from peripheral blood and sperm tissues. In each case 4 markers in azoospermia factor, (AZF) regions were tested: sY84, (AZFa), sY127, (AZFb), , sY255 (AZFc) using a multiplex PCR procedure.

Our results our success to get a new multiplex PCR procedure and show's an absence of microdeletions on AZF loci at the tested infertile men's. Our findings show that the microdeletion of the AZF is a rare event. Starting know, the combination karyotype and a molecular investigation of the AZF loci are required for the management of azoospermia in our country.

**Keywords :** male infertility, AZF locus, SRY, Y chromosome microdeletions, multiplex PCR.

**Laboratoires de recherche :**

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Président du jury :** SATTA Dalila (Pr - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Encadreur :** Mr. BENZAADA Mostefa (MCB - Université de Khenchela).

**Examineur :** REZGOUN Mohamed Larbi (MCA - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire : 2018 - 2019

Présenté par : ZEGHICHI Mohamed Ragheb  
Aimene

**Titre**

**DIAGNOSTIC PAR PCR DES MICRODELETIONS DU CHROMOSOME Y DANS  
LE CADRE DE LA PRISE EN CHARGE DES INFERTILITES MASCULINES.**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique**

**Résumé**

L'infertilité est un souci majeur pour l'avenir de l'humanité, puisque le facteur masculin est impliqué dans plus de 50 % de cas des couples infertiles. Un des problèmes majeur dans la prise en charge de cette pathologie est le peu d'outils de diagnostic de l'infertilité masculine. En effet, mis à part le spermogramme et le bilan hormonal, il est rare de voir proposer aux hommes infertiles un caryotype et/ou une investigation des microdélétions du chromosome Y. A noter que ces deux analyses couvrent à elles seules plus de 25% de cas d'infertilité.

Nous proposons dans notre travail, une stratégie de mise au point d'un diagnostic des microdélétions du chromosome Y par la PCR multiplexe, en prenant en compte les conditions nationales, difficultés d'accéder au diagnostic moléculaire, par manque de moyens.

Pour optimiser les conditions de PCR, nous avons procédé en 3 phases, choisir en premier une Taq polymérase performante, fixer les conditions expérimentales, par le choix des amorces et de leurs température d'hybridation, enfin appliqués ces conditions pour réaliser une PCR multiplexe.

Notre protocole expérimental pour le diagnostic moléculaire des microdélétions du chromosome Y peut-être proposé dans le cadre de l'investigation de l'infertilité masculine à la recherche d'éventuelles microdélétions du locus AZF responsables de plus de 7% de cas d'infertilité masculine.

**Mots-clefs :** infertilité masculine, locus AZF, SRY, microdélétions du chromosome Y, PCR multiplexe.

**Laboratoires de recherche :**

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Président du jury :** SATTA Dalila (Pr - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Encadreur :** Mr. BENZAADA Mostefa (MCB - Université de Khenchela).

**Examineur :** REZGOUN Mohamed Larbi (MCA - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).