

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

N° d'ordre.....

N° de série.....

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Option : Biochimie appliquée

Intitulé :

**Etude épidémiologique et exploration du protéome
séminal des patients atteints d'une azoospermie par la
technique d'électrophorèse monodimensionnelle**

Présenté par :

Soutenu Le :12/09/2020

- BENSALHIA Khaoula
- ALIOUCHE Amira

Devant le jury :

- Président : Prof. KHELIFI Douadi, UFMC1
- Examineur: Dr. BECHKRI Sakina, UFMC1
- Encadreur : Dr. BELLIL Inès, UFMC1

Année universitaire 2019/2020

Remerciements et Dédicaces

En préambule à ce mémoire, Nous souhaitons adresser nos remerciements Les plus sincères à Dieu qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

*Nous tenons tout d'abord à remercier Chaleureusement notre encadreur **Mme BELLIL INES**, on est très reconnaissantes du grand honneur que vous nous faites en acceptant de nous encadrer. Votre compétence, vos précieux conseils et votre aide durant toute la période du travail et vos qualités humaines suscitent notre grande admiration.*

Nous remercions les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail. Nous vous en sommes très reconnaissantes et en espérant être à la hauteur de votre confiance.

*Que Prof **KHELIFI DOUADI**, trouve ici l'expression de nos respectueuses gratitudee et le témoignage de nos profonds remerciements pour avoir accepté de présider ce jury et avant tout pour avoir accepté de nous accueillir dans votre laboratoire pour effectuer ce travail.*

*Nous remercions également l'examinatrice de ce travail Mme **BENCHRI SAKINA**. Nous vous adressons nos sincères remerciements et nos profonds respects pour l'intérêt que vous apportez à ce travail.*

*Nous tenons également à remercier **Dr Zoghmar A.** médecin biologiste de la clinique Ibn Rochd Constantine de nous avoir accepté au sein de son service de PMA, Ainsi que tout le personnel de la clinique IBN Rochd pour leur orientation et accueil sympathique et chaleureux lors des jours précédant le stage.*

Nos remerciements vont également aux malades accueillis par le service PMA pour leur compréhension et coopération. Nous leur souhaitons un prompt rétablissement.

En fin nos remerciements à tous ceux qui ont aidé à l'élaboration de ce mémoire du pré ou du loin.

Je dédie ce mémoire à

A MES PARENTS BIEN-AIMÉS

Je voue dédie cette mémoire en reconnaissance de tout l'amour et de toute l'affection que Vous n'avez jamais cessé de me prodiguer.

Il n'est pas de mots assez forts pour exprimer mon immense amour et ma profonde Gratitude pour tous les sacrifices et les efforts qu'avez consentis pour mon éducation.

Vous m'avez toujours guidée, soutenue, conseillée avec la plus grande des sagesse.

Je prie Dieu, le tout puissant, de vous accorder santé et longue vie afin que je puisse Vous combler à mon tour sans jamais vous décevoir.

A mes très chères sœurs Raounek et Amani

Tous les mots n'expriment pas mon amour et ma gratitude pour vous. Vous qui m'avez soutenu tout au long de mon parcours.

Que Dieu vous donne santé et vous garde, et vous procure bonheur, et grand succès.

Et à tous ceux qui me sont chers...

BENSALHIA Khaoula

Je dédie ce modeste travail :

A ma famille, grâce à qui j'en suis là aujourd'hui, parce que vous avez toujours cru en moi et m'avez soutenue. Vous avez tous contribué à votre manière à cette réussite.

Je remercie mes chers parents ma mère et mon père pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements.

A mes chères sœurs Amína et Rayene et mon cher frère Djellel.

Qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite.

A mes proches et amies sans exception.

Merci !

AMIRA ALIOUCHE

Table des matières

Liste des Abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale.....1

Chapitre 01 : Revue bibliographique

I. Anatomie du système génital de l'homme.....	3
1. Les organes génitaux externes.....	3
1.1. Le pénis	3
1.2. Le scrotum	4
2. Organes génitaux internes et voies spermatiques.....	4
2.1. Testicules.....	4
2.2. Voies spermatiques	5
2.2.1. Les voies spermatiques intra-testiculaires	5
2.2.2. Les voies spermatiques extra testiculaires	5
3. Les glandes Annexes.....	7
3.1. La vésicule séminale.....	7
3.2. La prostate.....	7
3.3. Les glandes de COWPER.....	7
4. Spermatogenèse	8
5. Le plasma séminal	10
II. Infertilité masculine	15
1. Définition.....	15
1.1. Fertilité et Infertilité	15
1.2. Fécondité et infécondité	15
1.3. Fécondabilité	15
1.4. La stérilité	15
2. Anomalies liées aux spermatozoïdes et plasma séminal	15
2.1. Azoospermie	16
2.1.1. L'azoospermie sécrétoire ou non obstructive	17
2.1.1.1. Les maladies congénitales	17
2.1.1.2. Les maladies acquises	17
2.1.2. L'azoospermie excrétoire ou obstructive	19
2.1.2.1. Diagnostic	19

2.1.2.2.	Les causes d'azoospermie obstructive	20
3.	Facteurs de risque de l'infertilité masculine	20
3.1.	L'âge	20
3.2.	L'obésité	21
3.3.	Chaleur	21
3.4.	Tabac et alcool	21
3.5.	Les antécédents d'infertilité dans la famille	21
3.6.	Autres facteurs de risques	22
4.	Bilan d'infertilité masculine	22
4.1.	Interrogatoire	22
4.2.	Examen clinique	22
4.3.	Bilan paraclinique de première intention	22
4.3.1.	Le spermogramme	22
4.3.2.	Le spermocytogramme	23
4.4.	Biochimie du plasma séminal	24
1.	Définition	25
2.	Différents types de biomarqueurs	25
2.1.	Classification des biomarqueurs selon leur nature biochimique ou la technique ayant permis de développer le biomarqueur	25
2.2.	Classification des biomarqueurs par catégorie selon les autorités de Santé	26
2.3.	Classification des biomarqueurs selon leurs fonctions	26
2.3.1.	Biomarqueurs physiopathologiques et biomarqueurs de diagnostic	26
2.3.2.	Biomarqueurs pronostiques	27
2.3.3.	Biomarqueurs prédictifs	27
2.4.	Classification des biomarqueurs selon la nature de la variable mesurée par la méthode de dosage du biomarqueur	27
4.	Les biomarqueurs séminaux	28
4.1.	Les marqueurs biochimiques séminaux	28
4.2.	Les biomarqueurs protéiques d'azoospermie dans le plasma séminal	30
4.2.1.	L'inhibine B et AMH	30
4.2.2.	TEX101 et ECM1	31
5.	Rôle des biomarqueurs séminaux	32

Chapitre 02 : Matériel et méthodes

I. Matériel	33
1. Matériel biologique	33
1.1. Recrutement des patients	33
1.2. Paramètres étudiés	33
1.2.1. Paramètres épidémiologiques	33
1.2.2. Paramètres cliniques	34
1.3. Le prélèvement de sperme	34
1.4. L'obtention de liquide séminal	34
II. Méthodes	35
1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	35
1.1. Méthode Bradford (1976)	35
1.1.1. Principe	35
1.1.2. Réalisation de la courbe étalon	36
2. Extraction des protéines séminales dans des conditions dénaturantes et réductrices	37
3. Électrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide	38
4. Révélation des bandes protéiques après migration électrophorétique	38
4.1. Coloration	38
4.2. Décoloration	38
5. Lecture des électrophoregrammes	38
6. Analyse statistique	38

Chapitre 03 : Résultats et discussion

I. Données épidémiologiques	39
1. Répartition des patients selon l'âge	39
2. Répartition des patients selon les wilayas	39
3. Répartition des patients selon les types d'infertilité	40
4. Répartition des deux types d'infertilité en fonction de l'âge	40
5. Répartition des patients selon la profession	41
6. Répartition des patients selon les antécédents Pathologiques	41
7. Répartition des patients selon les pathologies associées	42
8. Répartition des patients selon les habitudes de vie toxiques	43
9. Répartition des patients en fonction des bains chauds	43

10. Répartition des patients selon l'âge et l'IMC.....	44
II. Analyse du taux de protéines dans le liquide séminal des patients.....	45
III. Fractionnement des protéines séminales et recherche de biomarqueurs	46
1. Analyse des profils électrophorétiques.....	46
2. Conséquence de l'azoospermie sur le protéome séminal.....	48
3. Etablissement des diagrammes types	49
4. Etude de la variabilité des protéines séminales dénaturées et réduites.....	51
5. Classification hiérarchique des protéines séminales	52
6. Indice de similarité des diagrammes protéiques des échantillons	54
Conclusion et perspectives.....	56
Références bibliographiques.....	58
Annexe 1.....	I
Annexe 2.....	II
Résumé	
Abstract	
ملخص	

Liste des abréviations

AAPS	American association of pharmaceutical scientists
ABP	Androgen binding protein
ACRV1	Acrosomal vesicle protein 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMH	Anti-müllerian hormone
APS	Persulfate d'ammonium
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BG	β -glucuronidase
BSA	Le sérum albumine bovine
DHT	Dihydrotestostérone
ECM1	Extracellular matrix protein 1
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FIV	Fécondation in vitro
FSH	Follicule Stimulating Hormone
GGT	Gamma-glutamyl transpeptidase
HTA	Hypertension Artérielle
IAS	Indice de similarité absolue
ICSI	Injection intracytoplasmique de spermatozoïde
IGF	Insulin-like Growth Factor
IMC	Indice de masse corporelle
IRS	Indice Relatif de Similarité
LDH	Lactate déshydrogénase
LGALS3BP	Lectin, galactoside binding soluble 3b
MMP	Les métalloprotéases matricielles
NAG	β -N acétylglucosaminidase

NOA	Non-obstructive azoospermia
OA	Obstructive azoospermia
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAP	Phosphatase acide prostatique
PCR	Polymerase Chain Reaction
PH	Potentiel Hydrogène
PMA	Procréation médicalement assistée
PSA	Prostatic specific antigen
PSP-94	Prostate secretory protein 94
PTGDS	Prostaglandin D2 Synthase
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SOD	Superoxyde dismutase
SP	Plasma séminal
TCA	Trichloroacetic Acid
TEMED	N, N, N', N'-Tetra methyl ethylene diamide
TESE	Testicular sperm extraction
TEX101	Testis-expressed protein 101
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition du plasma séminal en fonction des différentes portions du tractus génital	11
Tableau 2: Principales anomalies sperme	16
Tableau 3: Paramètres spermatique définis selon Les critères OMS.....	23
Tableau 4: Comparaison des techniques de découverte des biomarqueurs usuelles	25
Tableau 5: Signification des taux des marqueurs biochimiques	29
Tableau 6: Caractéristiques des marqueurs étudiés	31
Tableau 7: Différenciation des étiologies de l'azoospermie avec les biomarqueurs protéiques à base de plasma séminal	32
Tableau 8: Préparation de solutions étalon	36
Tableau 9: Répartition des patients selon les antécédents pathologiques	41
Tableau 10: Répartition des patients en fonction des bains chauds	43
Tableau 11: Distribution des patients selon l'âge et l'IMC	44
Tableau 12: Matrice binaire des protéines séminales dans des conditions dénaturantes réductrices révélées par SDS-PAGE.....	50
Tableau 13: Variabilité des protéines séminales.....	51
Tableau 14: Indices de similarité des protéines séminales dénaturées et réduites révélées par SDS-PAGE.	55

Liste des figures

Figure 1: appareil reproducteur masculin..	3
Figure 2: Structure générale de testicule..	4
Figure 3: Schéma de la phase de multiplication des cellules germinales mâle	8
Figure 4: Schéma de la formation du spermatozoïde durant la spermiogénèse	9
Figure 5: Différents obstacles à l'excrétion des spermatozoïdes	19
Figure 6: Forme atypique des spermatozoïdes vue sous microscope optique (G ×100)	24
Figure 7: Différents statuts réglementaires d'un biomarqueur relatifs aux étapes du processus de qualification	26
Figure 8: Etapes du processus de validation d'un biomarqueur et de la méthode de dosage associée.	28
Figure 9: Structure de bleu de coomassie.	35
Figure 10: Courbe étalon de dosage des protéines par la méthode de Bradford et al., 1976.	37
Figure 11: Répartition des patients en fonction de l'âge.	39
Figure 12: Répartition des patients selon les wilayas.	39
Figure 13: Répartition des patients selon les types d'infertilité.	40
Figure 14: Répartition des deux types d'infertilité en fonction de l'âge.	40
Figure 15: Répartition des patients selon la profession.	41
Figure 16: Répartition des patients selon les antécédents pathologiques.	42
Figure 17: Répartition des patients selon les pathologies associées.	42
Figure 18: Répartition des cas en fonction des habitudes de vie toxique.	43
Figure 19: Histogramme de distribution des patients selon l'âge et selon l'IMC.	44
Figure 20: La concentration des protéines séminales de chaque échantillon.	45
Figure 21: Distribution des échantillons selon la concentration des protéines séminales.	45
Figure 22: Profils électrophorétiques des protéines séminales dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE.	48
Figure 23: Dendrogramme des 15 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et réductrices fractionnés par SDS/PAGE.	52

Introduction générale

Des origines de l'Humanité jusqu'à nos jours, les hommes s'unissent avec les femmes pour la génération d'un nouvel être humain. Cette faculté de se reproduire est assurée par leur système génital dont le fonctionnement normal implique le bon déroulement de la reproduction humaine. Malheureusement des anomalies ou des pathologies peuvent l'affecter entraînant ainsi des troubles de son fonctionnement et rendant le couple infécond (Christian, 2005).

L'infertilité constitue un réel problème de santé publique dans toutes les sociétés, la stérilité a toujours été mal vécue. Par ignorance, la femme était pratiquement seule incriminée, particulièrement dans le contexte Algérien. Et devient alors la première cause de divorce en Algérie.

L'infertilité touche un nombre croissant de couples en âge de procréer. 15% des couples dans le monde souffrent d'infertilité, soit environ un couple sur dix (Drissi et al., 2015), ce qui représente un véritable problème de santé. En Afrique l'infertilité touche environ 25 à 40%. En Algérie on compte plus de 300.000 couples ne parviennent pas à concevoir un enfant, de manière naturelle. Cette statistique se traduit par, approximativement, entre 10% et 12% de la population ciblée (Hamdi, 2013).

En effet, l'infertilité est définie comme l'incapacité de concevoir après au moins douze mois de rapports sexuels non protégés (Schlosser et al., 2007). On parle d'infertilité primaire s'il n'y a jamais eu de grossesses, et d'infertilité secondaire si elle a eu lieu après une grossesse ou plus (Geidam et al., 2008).

L'infertilité est due à des facteurs féminins, masculins ou une combinaison des deux dans respectivement 30%, 20% et 40% des cas. Il reste 10% des cas de cause indéterminée ou dite « idiopathique » (Huyghe et al., 2007 ; Marcelli et al., 2009 ; Coat et al., 2011). Les causes d'infertilité masculine sont variées et souvent multifactorielles, se traduisant dans 61% des cas par une anomalie quantitative et/ou qualitative du sperme (Schlosser et al, 2007). Elle peut être expliquée par les variations physiologiques, génétiques et environnementales, le mode de vie (tabac, alcool, bains chauds) et les facteurs psychosociaux semblent affecter la production du sperme (Sharpe et al., 2002).

Pour évaluer la fertilité et l'infertilité masculines, le spermogramme et le spermocytogramme restent les examens clés. Des progrès considérables ont été faits ces dernières années dans la

Introduction générale

connaissance de la physiopathologie et par conséquent dans l'identification de biomarqueurs de la pathologie.

La détermination des biomarqueurs du sperme est très intéressante dans le cas d'azoospermie pour quantifier l'importance de la maladie, comme un indicateur pronostique, ou pour la prédiction et la surveillance de la réponse à une intervention, et aussi à éviter le besoin de tests plus invasifs. La recherche et l'identification de biomarqueurs de qualité du spermatozoïde apparaissent comme les enjeux fondamentaux dans le contexte de la fertilité masculine. Ces marqueurs permettront d'affiner l'analyse du sperme, et plus largement, d'améliorer la prise du couple en Procréation Médicalement Assistée (Jared M et al., 2016).

La composition en protéine de liquide séminal est le centre d'intérêt de nombreuses investigations ces dernières années. Certaines protéines du sérum sont reconnues comme marqueurs potentiels de maladies et peuvent également être retrouvées dans le liquide séminal. Ces similitudes entre les protéines du sérum et les protéines séminales ont encouragé les chercheurs à considérer le liquide séminal comme un fluide de diagnostic pour détecter des signes de pathologie (Duvilla et al., 2006).

Dans ce contexte le liquide séminal peut être considérée comme un milieu privilégié de diagnostic et/ou de suivi de cette maladie par la recherche de biomarqueurs dans le liquide séminal (Drabovich et al., 2013).

Dans cette optique nous avons initié notre étude qui a pour objectif principal d'explorer le protéome séminal des patients atteints de l'azoospermie et de rechercher des biomarqueurs séminaux de cette pathologie, en comparant les profils protéiques des patients malades avec celui d'un sujet sain par application de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE.

Le premier chapitre de ce mémoire comprend une synthèse bibliographique qui inclut un rappel anatomique de l'appareil génital male, une présentation générale sur l'infertilité masculine, nous intéressons également à l'azoospermie avec ses deux types obstructive et non obstructive ; tout en mettant l'accent sur le liquide séminal et ses composants ainsi que les biomarqueurs. Le deuxième chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisées. L'exploitation et la discussion des résultats sont présentées dans le troisième chapitre. Enfin, une conclusion résumant cette recherche et des perspectives clôturent cette étude.

I. Anatomie du système génital de l'homme

Les organes du système génital de l'homme comprennent les testicules, un réseau de conduits (épididyme, conduit déférent, conduit éjaculateur et urètre), les glandes sexuelles annexes (vésicules séminales, prostate et glandes bulbo-urétrales) et plusieurs structures de soutien, dont le cordon spermatique, le scrotum et le pénis (**Figure 1**) (Manuel, 2010).

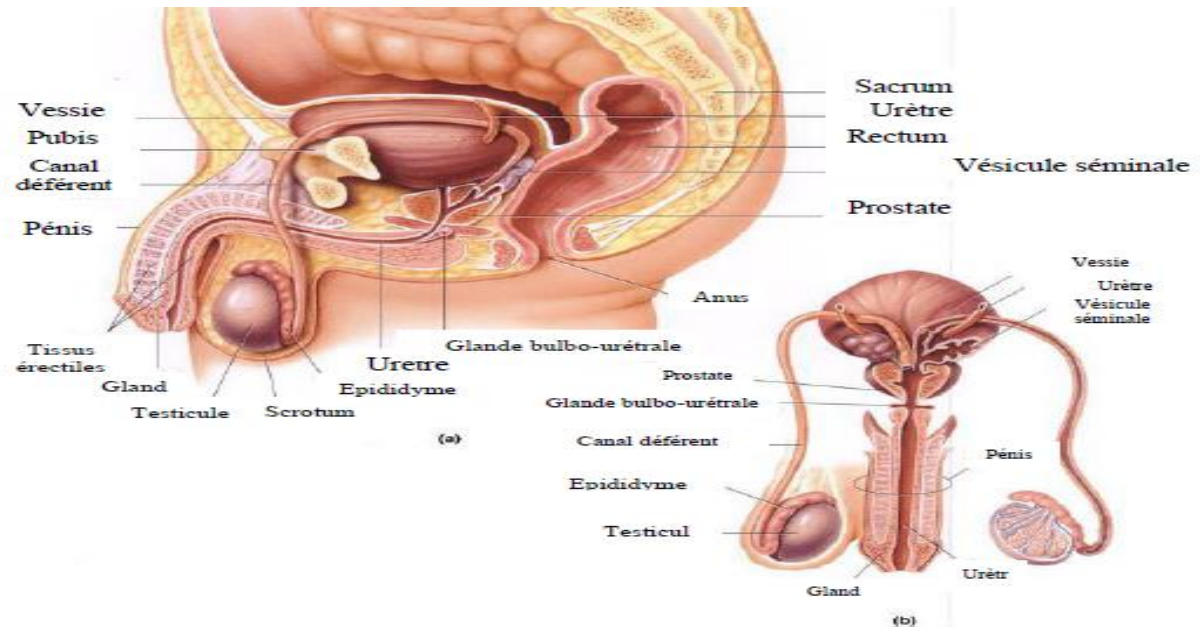


Figure 1: appareil reproducteur masculin. (a- coupe sagittale du bassin ; b- vue postérieure des organes reproducteurs.) (Manuel, 2010).

1. Les organes génitaux externes

Comprennent le pénis et le scrotum

1.1. Le pénis

La verge ou pénis est l'organe de copulation et de miction chez l'homme. Cette double fonction est assurée grâce au tissu érectile et à l'urètre. Le pénis est situé au-dessus des bourses, à la partie antérieure du périnée. Il est constitué par deux corps caverneux et un corps spongieux. Il peut être divisé en 3 parties :

- Une partie postérieure ou racine qui est fixe ;
- Une partie moyenne ou corps du pénis, qui forme la partie principale de la portion mobile du pénis ;
- Une partie antérieure ou gland qui est l'extrémité terminale du pénis (Rouvière, 1992).

Synthèse Bibliographique

1.2. Le scrotum

Encore appelé la bourse, est un sac à l'intérieur duquel sont logés les gonades mâles, Il a principalement deux rôles : un rôle de protection testiculaire et un rôle de maintien de la température ambiante au niveau testiculaire (en saison froide il se rétracte et en saison chaude il se dilate) (Terriou et al., 2000).

2. Organes génitaux internes et voies spermatiques

2.1. Testicules

Les testicules ou gonades mâles sont des organes pairs placés au-dessous de la verge dans les bourses ; Chaque testicule a la forme d'un petit œuf aplati transversalement, dont le grand axe est oblique de haut en bas et d'avant en arrière. Il mesure 4 à 5 cm de longueur, 2,5 cm d'épaisseur et 3 cm de hauteur, pesant en moyenne 20 g (Rouvière et Delmas, 1992). Une coupe verticale du testicule menée suivant le grand axe montre que l'organe est entouré d'une membrane fibreuse appelée « albuginée ». Cette membrane est résistante, inextensible et donne au testicule sa coloration blanc-nacrée (**Figure 2**) (Blanc et Porcu, 2002). Les testicules sont constitués d'un assemblage de divers éléments : les tubes séminifères et les espaces interstitielles. Ils sont dotés d'une double fonction :

- ✓ Une fonction exocrine dont le produit final est représenté par les spermatozoïdes ; cette fonction est assurée par les tubes séminifères qui contiennent les éléments de la lignée germinale et les cellules de SERTOLI.
- ✓ Une fonction endocrine qui consiste en l'élaboration de diverses hormones testiculaires, fonction assurée par les cellules de LEYDIG (Coulibaly a. Oumar ,2001).

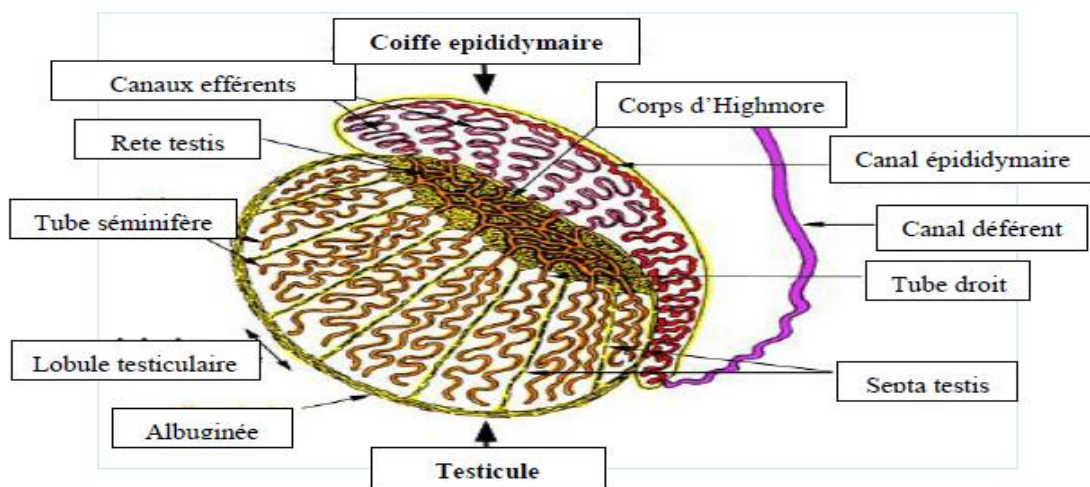


Figure 2: Structure générale de testicule (Blanc et Porcu, 2002).

Synthèse Bibliographique

2.2. Voies spermatiques

Les spermatozoïdes élaborés dans les tubes séminifères vont être évacués grâce à un système de canaux constituant les voies excrétoires du sperme. A ces conduits, sont annexés des glandes dont les produits de sécrétion participent à la constitution du sperme. On distingue 2 catégories de voies spermatiques ; les uns sont intra-testiculaires, les autres extra-testiculaires.

2.2.1. Les voies spermatiques intra-testiculaires

- **Les tubes séminifères contournés**

Chaque lobule contient environ 40 tubes séminifères contournés d'un diamètre de 140 à 300 µm et une longueur de 30 à 60 mm. C'est dans ces tubes que se forment les spermatozoïdes qui sont ensuite transportés dans les tubes séminifères droits.

- **Les tubes séminifères droits**

Conduits de 1mm de long, sur le plan histologique le tube droit est tapissé d'un épithélium simple cubique ou aplati.

- **Le rete-testis**

Ou réseau de HALLER constitue d'avantage des lacunes que des canaux creusés dans le corps d'HIGMORE ; sur le plan histologique, il est recouvert d'un épithélium cubique simple. Ces deux dernières voies apparaissent comme des voies excrétrices du sperme, les spermatozoïdes observés à ces niveaux ne sont pas doués de mouvements propres. D'un point de vue médical, il peut exister de façon congénitale ou se produire de façon secondaire, une oblitération de ces voies étroites ; il s'ensuit une azoospermie excrétrice qui peut être localisée seulement à un territoire du testicule (Terriou et al., 2000).

2.2.2. Les voies spermatiques extra testiculaires

- **Les Cônes efférents**

Ils appartiennent à l'épididyme dont ils constituent le *globus major*, tapissés histologiquement d'un épithélium festonné reposant sur une membrane basale (Ounis, 2014).

Synthèse Bibliographique

- **L'épididyme**

Organe allongé sur le bord postérieur du testicule dont il constitue le début de la voie excrétrice (Coulibaly a. Oumar, 2001), il est androgéno dépendant qui concentre le sperme et permet la viabilité des spermatozoïdes en assurant leur mobilité et leur pouvoir fécondant (Staerman F et Hermabessiere J, 1993). On lui décrit trois parties :

- Une partie antérieure renflée, *la tête* ;
- Une partie moyenne, *le corps* ;
- Une extrémité postérieure, *la queue*.

- **Le canal déférent**

C'est le prolongement de l'épididyme qui aboutit à la prostate par son ampoule. Il fait directement suite au canal épидидymaire : c'est un élément du cordon spermatique et il mesure environ 40 cm de long pour un diamètre de 2 à 1 mm partant de la queue de l'épididyme. Le canal déférent n'est pas une simple voie excrétrice du sperme, la présence de cellules de type glandulaire, le rapproche du canal épидидymaire. Il est parcouru d'ondes péristaltiques qui assurent la progression des sécrétions testiculo-épидидymaires. Quant à l'ampoule du canal déférent, elle apparaît comme un réservoir à l'intérieur duquel s'accumule le sperme dans l'intervalle des éjaculations (Coulibaly a. Oumar, 2001).

- **Conduit éjaculateur**

Long de 2cm sur 1 mm de diamètre, il s'étend du point d'abouchement de la vésicule séminale dans le canal déférent à l'urètre prostatique ; son calibre diminue progressivement de son origine à sa terminaison. C'est un simple conduit vecteur (Langman, 1984).

- **Urètre**

L'urètre est la portion terminale des voies génitales de l'homme, parce qu'il transporte l'urine lors de la miction et le sperme lors de l'éjaculation. Il se divise en trois parties : (a) la partie prostatique de l'urètre, qui est enveloppée par la prostate ; (b) la membranacée de l'urètre, qui se trouve dans le diaphragmeuro-génital ; et (c) la partie spongieuse de l'urètre (partie pénienne), qui passe dans le pénis et s'ouvre sur l'extérieur par le méat urétral. La partie spongieuse de l'urètre mesure à peu près 15 cm elle compte pour environ 75 % de la longueur totale de l'urètre (Schlosser et al., 2006).

Synthèse Bibliographique

3. Les glandes Annexes

Ce sont les vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales de COWPER, elles sont annexées aux voies excrétrices masculines. Ces glandes produisent la majeure partie du sperme. Leurs produits de sécrétion sont déversés dans les voies excrétrices spermatiques.

3.1.La vésicule séminale

Glande en forme de petit sac dans laquelle s'accumule le sperme dans l'intervalle des éjaculations. Ce sont des organes à parois bosselées, très irrégulières, de dimension très variables suivants les individus (de 12 à 77 mm de long sur 15 à 30 mm de large). Ses sécrétions alcalines (pH : 7,19) représentent avec les sécrétions prostatiques la majorité de la masse du sperme et contiennent du fructose qui est une source d'énergie pour le déplacement des spermatozoïdes. La vésicule séminale s'abouche dans le canal déférent juste avant sa pénétration dans la prostate (Larsen et al., 2007).

3.2.La prostate

Glande génitale masculine annexe. Elle apparaît comme un organe musculo-glandulaire, impair et médian elle est située entre le fond de la vessie et le muscle transverse profond du périnée de 1 à 1,5 cm en arrière de la symphyse et en avant du rectum à partir duquel elle peut être palpée. La prostate est perforée par l'urètre et par les deux canaux éjaculateurs. Elle sécrète un liquide riche en enzyme (dont les phosphatases) et en prostaglandine (Siffroi, 2001).

3.3.Les glandes de COWPER

Elles sont encore appelées glandes de MERY-COWPER. Elles sont constituées de deux petites masses glandulaires de la taille de petites noisettes situées à la Jonction de l'urètre spongieux dans l'épaisseur de l'aponévrose pénienne moyenne. Elles possèdent un canal excréteur relativement long chez l'homme adulte, qui atteint 30 à 40 mm. Ce canal s'ouvre sur la paroi postérieure de l'urètre pénien au niveau de la partie antérieure du cul-de-sac du bulbe (Langman, 1984).

Synthèse Bibliographique

4. Spermatogénèse

La spermatogénèse est le processus de division et de différenciation cellulaire de cellules souches appelées spermatogonies en gamètes males ou spermatozoïdes. Elle s'effectue dans l'épithélium tapissant les tubes séminifères du testicule tout au long de la vie génitale de l'homme à partir de la puberté jusqu'à un âge très avancé. Elle se déroule en plusieurs phases :

- ❖ La phase de multiplication : Les analyses histologiques ont permis de distinguer trois types de spermatogonies : Ad (d=dark), Ap (p=pâle) et B qui sont localisées tout près de la paroi de tube séminale (Govin, 2006) ; les cellules souches spermatogonie de type Ad prolifèrent par mitose pour assurer leurs renouvellements et donner une spermatogonie de type Ap qui se divise pour donner deux spermatogonies de type B. Cette dernière a une forte capacité de transcription permettant de synthétiser les protéines nécessaires à l'étape de mitose qui va suivre (Govin et al., 2006) (**figure 3**).
- ❖ La phase de maturation : les cellules germinales vont doubler leurs contenu ADN au cours de la méiose, ensuite les spermatocytes subissent deux divisions nucléaires successives afin de donner naissance à quatre cellules germinales haploïdes, le spermatocyte I a $2n$ chromosome subit deux division nucléaires successives pour donner naissance à quatre cellules germinales haploïdes spermatocytes II à n chromosomes, ce dernier se transforme en spermatide qui ne se divise plus (Govin et al., 2006).

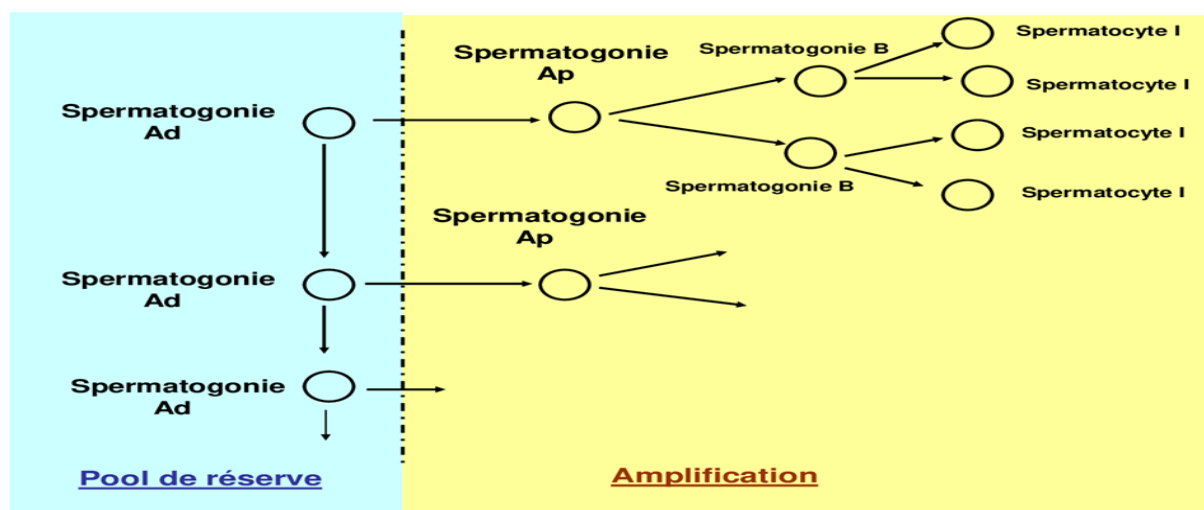


Figure 3: Schéma de la phase de multiplication des cellules germinales mâle (Selon Humeau et Arnal 2005, reproduction et développement, SaurampsMedical).

Synthèse Bibliographique

❖ La spermiogénèse : cette étape a lieu dans les tubes séminifères, elle correspond à la différenciation terminale pendant laquelle la spermatide se transforme en spermatozoïde définitif, c'est-à-dire il perd son cytoplasme superflu et est doté d'une queue. Chez l'homme le temps nécessaire à la formation d'un spermatozoïde à partir d'une spermatogonie est d'environ 74 jours (seifer et al.,1996 ; França et al., 2005). Si l'une de ces étapes est non fonctionnelle la spermatogénèse sera altérée ce qui va causer la stérilité chez l'homme (Bourgeron et al.,1996) (**figure 4**).

❖ Le spermatozoïde est une cellule autonome qui mesure 100 à 150 μm de long. Il est constitué de deux parties distinctes : la tête et le flagelle. La tête a un contour très régulier ovalaire avec un grand axe mesurant 5 μm et un petit axe mesurant 3 microns (avec un rapport de grand axe sur petit axe égale 1,66) (Terriou et al, 2000). et le flagelle mesure environ 45 μm avec un diamètre de 0,4 à 0,5 μm . Il a un contour régulier et un aspect homogène.

Le spermatozoïde est constitué d'un segment intermédiaire situé à la base du renflement (Manuel, 2010), son rôle est d'assurer l'énergie (sorte de réservoir de carburant). La pièce intermédiaire normale peu visible en microscopie conventionnelle, mesure 1,5 à 9 fois la longueur de la tête, a un diamètre de 0,6 à 0,8 micron. Son grand axe est dans le prolongement du grand axe de la tête.

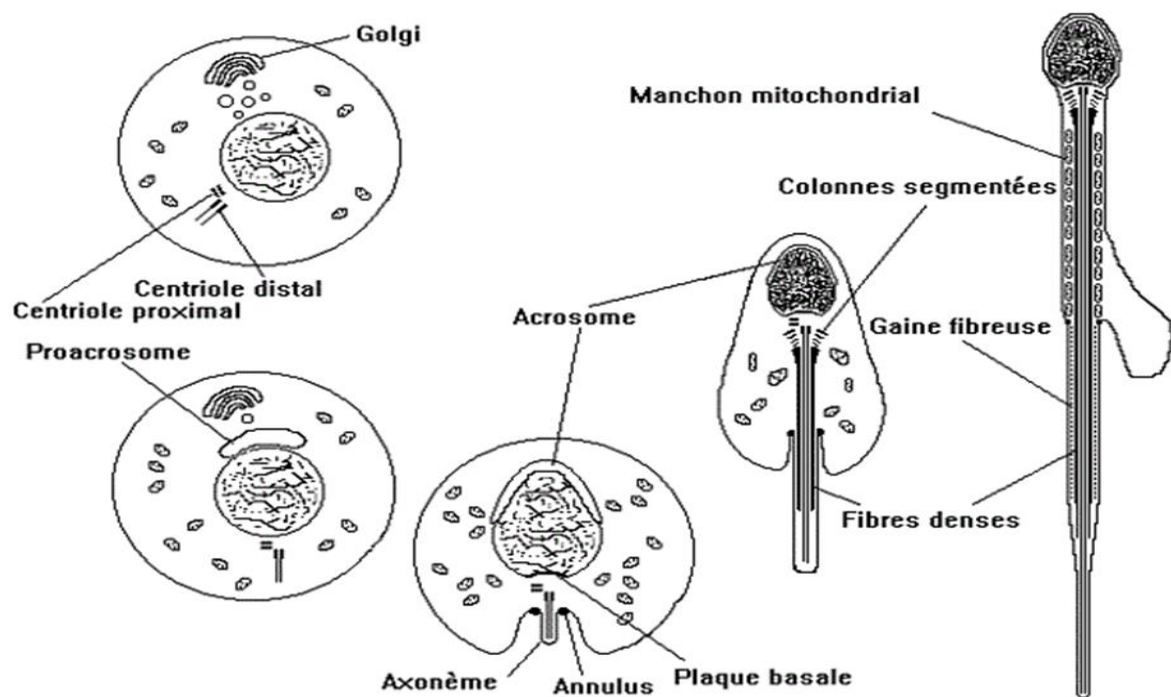


Figure 4: Schéma de la formation du spermatozoïde durant la spermiogénèse.

Synthèse Bibliographique

5. Le plasma séminal

Le plasma séminal, milieu de transport et de survie des spermatozoïdes, entre en contact avec ces derniers au moment de l'éjaculation. Il s'agit d'un fluide biologique complexe contenant un très grand nombre de substances (**Tableau 1**) secrétées aux différents niveaux de l'appareil génital :

- Au niveau de l'épididyme, le lieu de maturation des spermatozoïdes ou de nombreuses modifications ont lieu. La composition du fluide épидидymaire est riche en ions (Ca, P, Cl, Na...), en composés sucrés (glycérol, inositol...), en enzymes (α 1-4 glucosidase, glycosyltransférase...), ainsi qu'en protéines et en stéroïdes (testostérone, DHT).
- Au niveau des vésicules séminales ; la fonction la plus connue est la coagulation du sperme, qui se produit immédiatement après l'éjaculation et implique principalement la séménogéline et la fibronectine. Le fructose et le glucose participent au métabolisme énergétique des spermatozoïdes, la sphingomyéline aurait un effet stabilisant de membrane, les prostaglandines un effet antibactérien et la lactoferrine des vertus immunomodulatrices.
- Au niveau de prostate ; la sécrétion prostatique intervient dans la liquéfaction du sperme éjaculé. Le PSA (prostatic specific antigen) hydrolyse la séménogéline et la fibronectine, toutes deux responsables de la coagulation du sperme. La PAP (phosphatase acide prostatique) et d'autres protéases comme le pepsinogène C contribuent à la dissolution du coagulum (Saula et Alexandre, 2017).

Synthèse Bibliographique

Tableau 1: composition du plasma séminal en fonction des différentes portions du tractus génital (Saula et Alexandre, 2017).

	Epididyme	Vésicules Séminales	Prostate
Ions	Ca P Cl Na ...	+/-	Zn Na K ...
Composés Sucrés et azotés	Glycérol, inositol, Acide sialique, Carnitine ...	Acides aminés, Prostaglandines, Fructose, glucose	Citrate, spermine, spermidine, putrescine
Stéroïdes	Testostérone, DHT		
Enzymes	α 1-4 glucosidase, Glycosyltransférase, GGT, Catalase, SOD	AnhydraseCarbonique, 5-nucleotidase	PAP, pepsinogène, lactate déshydrogénase, protéines kinases, GGT, diamine oxydase ...
Lipides	Glycerophosphoryl Choline	Sphingomyéline, Phosphatidylsérine Cholestérol	Cholestérol
Protéines		Transferrine, Lactoferrine, Séménogéline, Fibronectine	Albumine, α -1 Glycoprotéine acide, PSA, EGF ...
PH	Acide	Alcalin	Acide
Proportion dans SP	5 %	65 %	30 %

De manière générale, l'activité sécrétoire est tout au long du tractus génital sous le contrôle des androgènes. Un déficit androgénique, quelle que soit son origine, réduit de façon significative les sécrétions, tant de l'épididyme que des vésicules séminales ou de la prostate. La testostérone atteint l'épididyme par la circulation mais surtout par le fluide testiculaire. Elle est convertie dans les cellules de l'épithélium épидидymaire ainsi que dans la prostate et les vésicules séminales en son dérivé actif la 5 α -DHT. D'autres hormones comme les œstrogènes, l'aldostérone ou la prolactine semblent également susceptibles d'agir au niveau de l'épididyme, sur les vésicules séminales et sur la prostate. Enfin, les innervations adrénérurgique et cholinergique des parois du tractus génital interviennent également dans la régulation des activités sécrétoires.

Synthèse Bibliographique

De nombreux acteurs sont donc indispensables au bon fonctionnement de l'appareil reproducteur masculin. Il est évident que des dysfonctionnements peuvent intervenir à chacune des étapes, pouvant ainsi avoir un retentissement sur la qualité du sperme et aboutir à une hypofertilité, voire une infertilité (Saula et Alexandre, 2017).

Le plasma séminal humain est également une source riche de protéines et phosphatases, aminopeptidases, glycosidases, hyaluronidase, mucine, etc.

- Les principales glandes accessoires de l'homme contribuent de manière différenciée au pool de protéines SP. Les principaux constituants protéiques du liquide séminal des vésicules sont principalement semenogelin I mais aussi semenogelin II, impliqués dans la gélification de ces derniers jaillissent de l'éjaculat (coagulum) et après liquéfaction donnent des produits ayant des fonctions biologiques claires telles que l'inhibition de la motilité des spermatozoïdes, l'activité antibactérienne, etc. Ainsi que d'autres protéines de vésicules séminales qui comprennent la lactoferrine, la fibronectine et l'inhibiteur de la protéine C.
- Les sécrétions de la prostate, bien que seulement représentant 20 à 30 % du volume total du SP, sont en contact direct et immédiat avec le plus grand nombre de spermatozoïdes et sont la première partie du SP à de faire face au canal cervical. La teneur en protéines se compose de trois grandes protéines, toutes sous hormone de régulation : PSA (Liant de zinc, famille Kallikrein, principalement libérés dans des prostasomes mais aussi produits par les glandes de Cowper), la phosphatase acide prostatique et la protéine prostatique spécifique riche en cystéine-94 (PSP-94, β -inhibin- β -microseminoprotéine). La fonction première du PSA est la liquéfaction du coagulum par hydrolyse des semenogélines, tandis que la phosphatase acide prostatique et la PSP-94 ont une action enzymatique, respectivement, sur le facteur de croissance (Rodriguez martinez et al., 2011).
- Comme pour la glande de Cowper (difficile à isoler par échantillonnage), elle contient une protéine extrêmement abondante : la mucine. De plus, les peptides sont un composant majeur du plasma séminal bien que la plupart d'entre eux sont soit des produits fragmentés de protéines de plasma séminal, soit des hormones peptidiques associées au sperme. D'autres enzymes sont également présentes dans la SP, telles que les glycosidases [β -glucuronidase (BG), α -glucosidase, β -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase et β -N acétylglucosaminidase (NAG), etc. La prostaglandine D2 synthase de type lipocaline. D'autres enzymes, telles que les lipases ou les métalloprotéases de la matrice (MMP), sont liées à la qualité du sperme (Rodriguez martinez et al., 2011).

Synthèse Bibliographique

- Les fonctions suggérées des protéines SP sont l'implication dans plusieurs étapes essentielles précédant la fécondation, telles que la régulation de la capacité, l'établissement du réservoir oviducal de sperme, la modulation de la réponse immunitaire utérine et du transport des spermatozoïdes dans l'appareil génital féminin, ainsi que dans les gamètes l'interaction et la fusion (Rodriguez martinez et al., 2011).
- A part les enzymes, la SP de la plupart des espèces contient des composés protéiques similaires à ceux présents dans le plasma sanguin, comme la pro-albumine, l'albumine, l' α -, β - et γ -globulines, la transferrine, certaines immunoglobulines, les facteurs de complément et les quantités différentielles des cytokines et les chimiokines.

En plus des sécrétions épидидymaires, prostatiques, vésiculaires ; le plasma séminal est un mélange des sécrétions testiculaires (les cellules germinales, et surtout les cellules de Sertoli).

- Les cellules germinales produisent aussi la LDH X ou C4 marqueur. La LDH X (Orlando C et al., 1988) est une isoenzyme de la LDH spécifique du testicule humain post-pubertaire. Elle facilite utilisation du lactate produit par les cellules de Sertoli. Elle catalyse la conversion lactate-pyruvate par l'intermédiaire de la régulation de FSH et insuline. Cette enzyme est donc vitale pour les processus métaboliques générateurs d'énergie pour la survie du gamète.
- Les cellules de Sertoli : Des études récentes *in vitro* ont permis l'identification de nombreuses protéines dont certaines sont spécifiques du testicule et d'autres identiques aux protéines sériques. Certaines peuvent être retrouvées dans le plasma séminal et y ont été dosées :
 - ✓ **ABP** : L'ABP est la première protéine d'origine testiculaire qui a été isolée. Elle est sécrétée à la fois au pôle basal (20-33%) et au pôle apical de la cellule. Elle transporte les androgènes (testostérone et DHT) aux cellules germinales et dans le fluide testiculaire. La quantité dans le plasma séminal est faible puisqu'il existe une réabsorption très importante (95%) au niveau du segment initial de la tête de l'épididyme. Elle existe sous 2 formes, I et II (Plymate et al., 1981).
 - ✓ **EGF** : Facteur de croissance synthétisé par la Sertoli. Les études effectuées dans le plasma séminal montrent une concentration supérieure à celle du sang. Elles comparent des populations d'hommes fertiles et infertiles. Les taux varient de 41 ng/ml à 53 ng chez les infertiles et de 41 ng à 48 ng chez les hommes fertiles (D'Cruz et Haas, 1989).

Synthèse Bibliographique

- ✓ **Activateurs du plasminogène** : Ce sont des protéases aussi secrétées par la Sertoli, présentant une activité fibrinolytique, elles transforment le zymogène et le plasminogène en plasmine. Elles seraient indispensables à la translocation des spermatocytes du compartiment basal au compartiment adluminal, ainsi qu'au relargage des spermatozoïdes matures lors de la spermiation. Dans le plasma séminal 2 types sont représentés un type urokinase uPA et un type tissulaire tPA. Ce dernier est le plus important du point de vue physiologique (480 ng/ml au lieu de 7 ng) (Mac Gregor I.R et al., 1987).
- ✓ **Ceruloplasmine** : Cette protéine secrétée par la Sertoli est identique à la protéine sérique. Elle transporte le Cu^{++} jusqu'aux cellules germinales. Elle est en quantité 25 fois inférieure à celle de la transferrine (1 à 6 μg /Ejaculat). Orlando en 1986 a montré dans son étude que la ceruloplasmine présente dans le plasma séminal venait principalement de la circulation puisque les taux étaient identiques chez les hommes fertiles (4,21) et vasectomisés (4,27) (Orlando C et al., 1986).
- ✓ **Somatomedin C ou IGF 1** : Peptide secrété par la Sertoli et peut-être l'épididyme. C'est un facteur de croissance qui stimule la synthèse de DNA des cellules de nombreuses espèces animales. Le taux est faible dans le plasma séminal : 20 ng/ml chez les hommes fertiles (Barnit et al., 1987).
- ✓ **Tesbumine** : Elle est immunologiquement et structuralement identique à la sérum-albumine. Elle est synthétisée par les cellules de Sertoli uniquement dans les tubes séminifères adultes. Elle sert probablement au transport des androgènes (testostérone). Orlando en 1988 a montré que, comme la Transferrine, 80% de l'albumine séminale était d'origine testiculaire (Orlando C et al., 1988).
- ✓ **Transferrine** : C'est une bêta glycoprotéine de PM 79000 Da synthétisée avec l'aide de la FSH par la cellule de Sertoli. Elle représente environ 5% des protéines nouvellement fabriquées par la Sertoli. Elle se différencie de la Transferrine sérique par ses glycosylations. Elle transporte les ions Fe^{++} à l'épithélium germinal en développement car des récepteurs ont été localisés sur les spermatocytes pachytènes et les jeunes spermatides. Des Etudes ont rapporté une quantité importante de Transferrine dans le plasma séminal humain, 80% de celle-ci serait d'origine sertolienne (Holmes S.D et al., 1982).

II. Infertilité masculine

1. Définition

1.1. Fertilité et Infertilité

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) l'infertilité est définie par l'absence de grossesse après au moins 12 mois de rapports sexuels réguliers et non protégés (OMS, 2000). Dans le cas contraire on parle de la fertilité qui est défini comme l'aptitude à concevoir un individu ou un couple est donc dit fertile s'il apte à obtenir une grossesse. L'infertilité peut être primaire en absence de grossesse après un minimum d'un an de rapport sexuels non protégés ou secondaire chez une femme qui a déjà eu une ou plusieurs grossesses (Lansac et Guérif, 2005).

1.2. Fécondité et infécondité

La fécondité est le fait d'avoir conçu. L'infécondité traduit donc l'absence d'enfant au sein d'un couple a un moment donné ; elle peut être primaire, si le couple n'a jamais démarré de grossesse, ou secondaire si une grossesse a été interrompue (fausse couche, avortement...).

1.3. Fécondabilité

Elle représente la probabilité d'obtenir une grossesse à chaque cycle menstruel et on l'utilise pour exprimer le degré de fertilité. Elle est de l'ordre de 25% quand la fertilité est normale mais elle varie de 0 à 65% d'un couple à l'autre du fait de différents facteurs (Lansac et Guérif, 2005)

1.4. La stérilité

Le terme de « stérilité » doit être réservé à l'incapacité totale et définitive de concevoir, diagnostic qui ne peut être posé que devant une cause évidente et non curable d'infertilité. Trois à quatre pour cent (3 à 4 %) des couples sont stériles (Schlosser et al., 2007).

La notion d'infertilité masculine renvoie à l'ensemble des pathologies et troubles touchant l'appareil reproducteur de l'homme et ainsi responsable de l'infécondité involontaire du couple.

2. Anomalies liées aux spermatozoïdes et plasma séminal

Jusqu'à 15 % des couples rencontrent un problème d'infertilité. Dans 20 % à 40 % des cas, un facteur masculin est en cause de façon isolée ou associée à une origine féminine. En pratique, on distingue différents types d'infertilité : l'aspermie, l'hypospermie, l'hyperspermie,

Synthèse Bibliographique

l'oligospermie, la sthénospermie, la Tératospermie, la nécrozoospermie, l'akinétopermie, la polyspermie ou polyzoospermie et l'azoospermie qui fait l'objet de notre étude.

Dans de nombreux cas d'infertilité masculine, les spermatozoïdes sont présents dans l'éjaculat mais présentent certaines anomalies (**Tableau 2**).

Tableau 2: principales anomalies sperme.

Volume	Hypospermie Hyperspermie Aspermie	Volume < 2 mL Volume > 7 mL Absence d'éjaculat
Concentration	Polyspermie Oligospermie Cryptospermie Azoospermie	> 200 x 10 ⁶ / mL < 20 x 10 ⁶ / mL Très rares spermatozoïdes, Absence de spermatozoïdes.
Mobilité	Asthénospermie Akinétopermie	Mobilité < 40 % Absence de spermatozoïde mobile.
Morphologie	Tératospermie	< 30 % formes typiques.
Vitalité	Nécropermie	< 50 % spermatozoïdes vivants.

2.1. Azoospermie

Elle se définit comme l'absence de spermatozoïde dans un éjaculat lors de la réalisation d'au moins trois spermogrammes pratiqués dans des conditions optimales et à 3 mois d'intervalle, ce diagnostic ne peut être affirmé que si l'on examine avec attention le culot de centrifugation avant et après coloration pour infirmer la présence de spermatozoïdes. Il faut être très prudent dans le diagnostic définitif de l'azoospermie car un phénomène infectieux sévère peut entraîner une azoospermie réversible (Hammamah et al., 1999).

Il faudra aussi éliminer les anomalies de l'éjaculation, les anéjaculations, les éjaculations incomplètes ou tout simplement des éjaculations rétrogrades. Un petit volume de sperme doit en ce moment alerter le clinicien et une recherche de spermatozoïdes dans les urines doit être systématiquement entreprise. Il existe deux types d'azoospermie :

Synthèse Bibliographique

2.1.1. L'azoospermie sécrétoire ou non obstructive

Elle correspond à l'absence de production de spermatozoïdes par les testicules. Le diagnostic consiste à un bilan para-clinique avec des taux élevés de FSH avec un arrêt de la spermatogenèse. Et L'examen clinique retrouve des antécédents de testicule non descendu ou de puberté retardée. Il met en évidence des testicules hypotrophiques ou inexistantes, les épидидymes et les canaux déférents étant normaux. L'échographie scrotale confirme l'état normal des épидидymes et déférents. L'origine de cette azoospermie peut être multiple. On distingue :

2.1.1.1. Les maladies congénitales

Le plus souvent liées à une anomalie des chromosomes sexuels parmi lesquelles :

- Anorchidie congénitale : Ce sont des sujets qui présentent des organes génitaux normalement développés, leur caryotype est XY, mais il n'existe pas de testicule. Les canaux déférents aboutissent à un noyau, rudiment d'épididyme (Jensen Jr et Morbeck De, 2011).

- *Le syndrome de Klinefelter* est la plus fréquente des anomalies gonosomiques chez l'homme, survenant chez 0,1 % à 0,2 % des nouveau-nés mâles. Il est dû à la présence d'un chromosome X supplémentaire entraînant un défaut de la spermatogénèse (Ravel et al., 2011), Il aboutit à une androgénisation incomplète avec gynécomastie, des testicules petits et mous, une atrophie constante des tubes séminifères avec infertilité et une atteinte variable des cellules de Leydig (Pienkowski et al., 2011).

- D'autres anomalies chromosomiques sont plus rares :
 - Anomalie de structure du chromosome Y.
 - Translocation entre X et autosomes, entre Y et autosomes.
 - Déplétion du chromosome Y.

2.1.1.2. Les maladies acquises

- L'orchite ourlienne de l'adulte est génératrice de lésions testiculaires pouvant aller jusqu'à l'azoospermie. Il s'agit d'une infection virale due au virus des oreillons mais peut être causée par d'autres virus, les coxsackies ou le virus de l'herpès, par exemple. Du fait de son caractère irréversible, elle rend souhaitable une prévention par vaccination dans l'enfance (Cocuzza et al., 2013).

Synthèse Bibliographique

- La cryptorchidie se définit par une non descente des testicules dans les bourses au cours du développement embryonnaire. Sa fréquence est estimée entre 3 et 5 % des nouveau-nés. Quand les deux testicules ne sont pas descendus, l'absence de traitement peut entraîner la stérilité. Le non traitement d'un seul testicule non descendu est fréquemment responsable d'une hypofertilité. Le traitement avant l'âge de 18 mois-2 ans permet d'espérer une diminution du risque d'infertilité (Sapin, 2014).
- La varicocèle est une dilatation des veines du plexus du scrotum, plus fréquente à gauche. Elle provoque une altération de la spermatogénèse due à une élévation de la température scrotale ou un défaut de perfusion testiculaire qui reste controversé. En effet, on retrouve ces dilatations veineuses chez 15 à 20% des hommes dans la population générale et elles ne sont pas plus fréquentes chez les hommes infertiles (Cocuzza et al., 2013).
- Hypogonadisme hypogonadotrophique : Il est d'origine centrale, de nature fonctionnelle. Il existe une lésion de la commande hypothalamo-hypophysaire. Les testicules sont normaux jusqu'à la puberté tout au moins, car ils peuvent involuer ensuite. Les hypogonadismes relèvent parfois d'une cause que l'on peut retrouver et traiter (tumeur, infection, etc...) mais très souvent il s'agit d'un hypogonadisme hypogonadotrophique idiopathique. Sur le plan clinique il s'agit de sujets adultes, de taille normale ou légèrement supérieur à la moyenne. L'appareil génital est infantile : verge pré pubère, micro testicule sensible à la pression, pas de poils pubiens. La biologie : le dosage de LH dans le plasma sanguin montre un taux anormalement bas (Jensen Jr et Morbeck De, 2011).
- Le syndrome des cellules de Sertoli isolées : Il est défini par l'absence ou la très grande pauvreté des cellules germinales à l'origine d'une azoospermie. Il se caractérise par une petite taille des testicules, la virilisation est normale, les dosages hormonaux également. La biopsie montre une absence ou pauvreté des cellules germinales avec ou sans altérations ultra-structurelles des cellules de Sertoli (Jensen Jr et Morbeck De, 2011).
- Le cancer du testicule, la maladie de Hodgkin, les lymphomes non hodgkiniens et les leucémies peuvent atteindre les hommes jeunes. Ces maladies et leurs traitements peuvent altérer la fertilité. Une irradiation de la région génitale entraîne souvent un arrêt définitif de la

Synthèse Bibliographique

spermatogénèse accompagné de stérilité. Parmi les différentes chimiothérapies anticancéreuses, ce sont celles recourant à des agents alkylants qui s'accompagnent le plus souvent d'un arrêt définitif de la spermatogénèse (Olivennes et al., 2006).

Cependant, plus de la moitié des azoospermies sécrétoires sont des formes idiopathiques.

2.1.2. L'azoospermie excrétoire ou obstructive

Elle correspond à une obturation des canaux (épididyme, canaux déférents ou canaux éjaculateurs) qui ne permettent pas l'extériorisation des spermatozoïdes malgré une production testiculaire normale (Nazzal, 2002) (**Figure 5**).

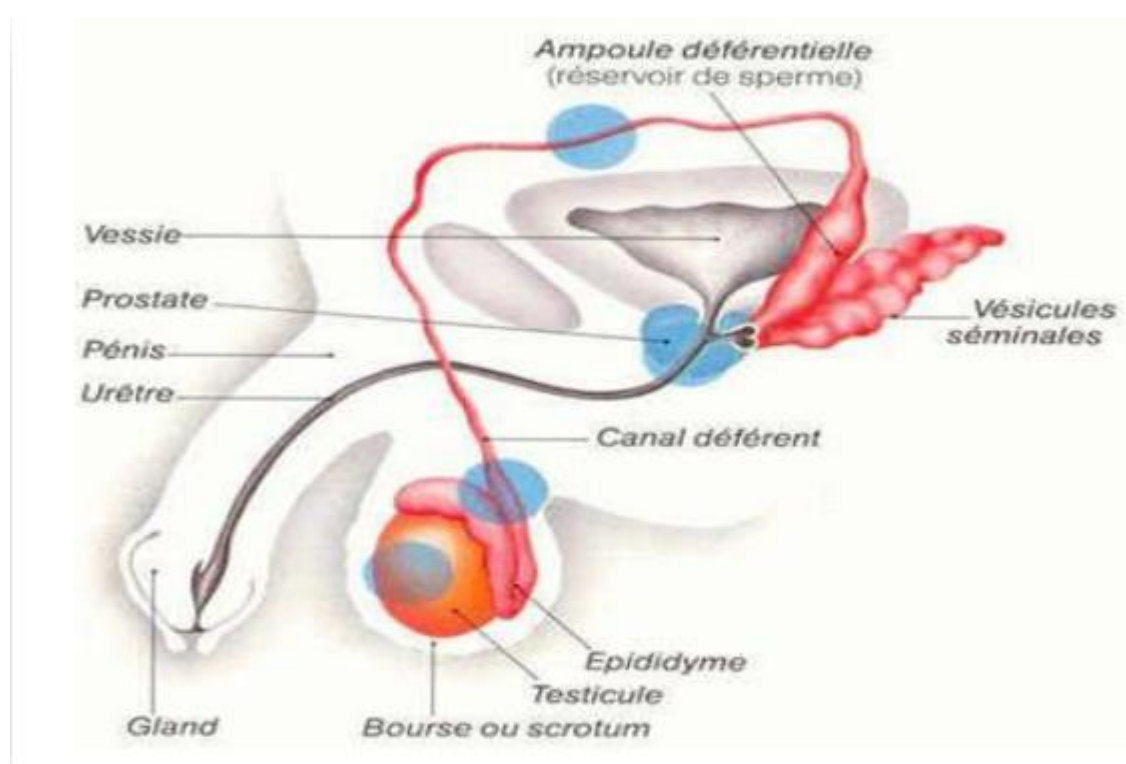


Figure 5: Différents obstacles à l'écoulement des spermatozoïdes.

Sur la figure 05, les cercles bleus représentent les différents obstacles possibles à l'écoulement des spermatozoïdes qui entraînent une azoospermie excrétoire acquise. Une azoospermie excrétoire peut être aussi due à une absence congénitale de vésicules séminales et de canaux déférents (agénésie vésiculo-déférentielle).

2.1.2.1. Diagnostic

L'examen clinique retrouve parfois des antécédents d'intervention chirurgicale ou d'infection génitale. Il met en évidence des épididymes distendus avec testicules normaux. Le bilan

Synthèse Bibliographique

paraclinique retrouve une azoospermie avec des taux normaux des hormones et une biopsie testiculaire normale. L'échographie génitale couplée au Doppler situe l'obstruction.

2.1.2.2. Les causes d'azoospermie obstructive

L'obturation des canaux peut avoir différentes origines :

- Les atteintes bilatérales de la voie excrétrice : ces atteintes par traumatismes, vasectomie ou séquelles chirurgicales peuvent être à l'origine d'une azoospermie excrétoire.
- Des malformations congénitales de l'épididyme, des canaux déférents ou des vésicules séminales.
- La tuberculose peut être à l'origine d'épididymite et de prostatite pouvant provoquer des perturbations du transport des spermatozoïdes.
- Les maladies sexuellement transmissibles (syphilis, gonorrhée, infection à Chlamydia) peuvent perturber la fertilité en provoquant des lésions inflammatoires de l'épididyme aboutissant à une azoospermie obstructive (Zoran J.-R et al., 2005).
- Les lésions neurologiques post-traumatiques (paraplégie, tétraplégie).
- Les troubles de l'éjaculation : dans certains cas, le sperme peut être éjaculé non pas vers l'extérieur mais vers la vessie : c'est l'éjaculation rétrograde. Ces troubles sont soit d'origine anatomique, neurologique, pharmacologique ou idiopathique. Les médicaments comme les neuroleptiques, les antidépresseurs tricycliques, les alpha-bloquants utilisés dans le traitement de l'adénome prostatique et certains antihypertenseurs peuvent être responsable d'une éjaculation rétrograde (M. Cocuzza et al., 2013).

Dans certains cas, la chirurgie permet de récupérer un transport « normal » des spermatozoïdes. Lorsque celle-ci n'est pas possible, des prélèvements de sperme à un niveau variable en fonction du siège de l'obstruction sont indiqués à la recherche de spermatozoïdes en vue d'une FIV avec ICSI et/ou de congélation.

3. Facteurs de risque de l'infertilité masculine

3.1. L'âge

Il est associé chez l'homme à une baisse de la fertilité, un homme de plus de 45 ans a entre 4,6 et 12,5 fois moins de chances de procréer par rapport à un homme de 25 ans (Blanc et al., 2002). Plusieurs études ont montré la relation entre l'âge et la diminution de volume spermatique, la mobilité des spermatozoïdes et l'altération de la morphologie des spermatozoïdes. Ainsi l'étude histologique des testicules de sujets âgés montre une dégénérescence des cellules germinales et

Synthèse Bibliographique

somatiques. Les études concernant l'effet de l'âge sur les accidents chromosomiques restent controversées (Martin et al., 1997).

3.2. L'obésité

Elle peut altérer la fertilité. Cet effet nuisible semble être principalement lié aux désordres de la sécrétion et du métabolisme des hormones sexuelles, pouvant entraîner un état d'hyposérotoninergie (et dans certains cas, un vrai hypogonadisme hypo gonadotrope) chez l'homme obèse. La dysfonction érectile accompagnant l'obésité (à cause des troubles cardiovasculaires), intervient indirectement dans l'altération de la fertilité, elle touche 17% des hommes entre 30 et 70 ans, mais ce taux grimpe à 45% lorsque l'index de masse corporelle dépasse 30 (Gnoth, 2005).

3.3. Chaleur

Plusieurs études ont pu lier la température ambiante de poste de travail et/ou la température scrotale de certains salariés (soudeurs ; chauffeurs) à la diminution des paramètres de sperme ; les mécanismes d'action suspectés de la chaleur sur la spermatogénèse sont l'induction d'une apoptose dans les cellules germinales immatures et/ou une atteinte fonctionnelle des cellules sertoli par différenciation (Iue et al., 2002).

3.4. Tabac et alcool

La consommation exagérée d'alcool a des effets néfastes sur la spermatogénèse car il inhibe la synthèse de testostérone aussi la consommation du tabac influe énormément sur la fertilité, certains composants du tabac (nicotine, cotinine, cadmiums...) ont été retrouvés dans le plasma séminal des fumeurs ; le plasma séminal devient alors un environnement toxique pour les spermatozoïdes, plusieurs équipes ont observé une diminution de la qualité du sperme chez les fumeurs ; altération de la mobilité des spermatozoïdes par le tabac qui est similaire à celle qu'il exerce sur les cellules ciliées du tractus bronchiques ; altération de la structure du flagelle ; augmentation de la tératospermie. Une étude faite récemment sur l'impact du tabac a montré l'importance des perturbations spermiologiques chez les patients fumeurs (Waiyee et al., 2003).

3.5. Les antécédents d'infertilité dans la famille

Ils constituent également un facteur de risque à cause de la composante génétique et héréditaire de ce trouble (Grazia et al., 2002).

Synthèse Bibliographique

3.6. Autres facteurs de risques

- Les troubles du développement et de la puberté.
- Les maladies de système : diabète, hypertension artérielle, dyslipidémie, affections respiratoires chroniques, pathologies inflammatoires.
- Troubles évolutifs ou antécédents psychiatriques (Houssein, 2017).

4. Bilan d'infertilité masculine

4.1. Interrogatoire

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

- La nature d'infertilité : primaire ou secondaire (paternité antérieure).
- La durée d'infertilité et les résultats des explorations et traitements déjà réalisés.
- L'âge de la partenaire.
- Les conditions et la qualité de la sexualité du couple et la fréquence des rapports sexuels au moment de l'ovulation.
- Présence ou non de troubles érectiles et/ou éjaculatoires.
- Utilisation de lubrifiants potentiellement toxiques pour les spermatozoïdes, les infections sexuellement transmises.
- Les pathologies notamment le diabète et l'affection respiratoire et les chirurgies antérieures, les antécédents reproductifs familiaux (Schlosser et al., 2006 ; Huyghea et al., 2007).

4.2. Examen clinique

L'examen clinique est une étape importante du bilan étiologique permettant souvent de tirer des renseignements ainsi d'orienter et interpréter les examens complémentaires.

L'examen doit évaluer tout l'appareil génital : verge, testicule, épididyme, déférent, prostate.

4.3. Bilan paraclinique de première intention

4.3.1. Le spermogramme

C'est un élément incontournable de l'évaluation de la fertilité masculine. Le recueil du sperme doit être réalisé au laboratoire, par masturbation, après un délai de 2 à 5 jours d'abstinence. Des valeurs de référence ont été définies par l'Organisation Mondiale de la Santé (Rowe et al., 2000 ; Staerman et Hermabessiere, 1993) (**Tableau 3**).

Synthèse Bibliographique

Tableau 3: paramètres spermatique définis selon Les critères OMS.

Le pH	7,2-8
Le volume d'éjaculat	≥1,5 ml
La concentration (numération)	≥ 15 Millions/ml spermatozoïdes dans l'éjaculat
La mobilité	≥ 32 % spermatozoïdes ayant un déplacement progressif ≥ 40 % spermatozoïdes mobiles
La morphologie	≥15% spermatozoïdes correctement formés
La vitalité ("éosine-test" = coloration des spermatozoïdes)	≥ 60%(pourcentage de spermatozoïdes vivants)
La recherche d'anticorps mixed antiglobulin reaction (MAR)	< 50 % ayant des anticorps fixés sur les spermatozoïdes
Les leucocytes	< 1 Million par millilitre

4.3.2. Le spermocytogramme

Il étudie essentiellement la morphologie des gamètes (spermatozoïdes). Il est déterminé par une coloration simple de schorr sur un frotti spermatique.

Le spermocytogramme va permettre la détection d'anomalies physiques et externes du spermatozoïde, il s'attache à détecter les anomalies intracellulaires du gamète et en particulier du noyau dont certaines caractéristiques au moyen de certaines colorations peuvent être observées au microscope.

Les anomalies détectées lors d'un spermocytogramme peuvent toucher la tête du spermatozoïdes (malformation la plus handicapante pour un démarrage de grossesse , la pièce intermédiaire, le flagelle, ou la présence d'un reste cytoplasmique. Ces anomalies peuvent être des facteurs de stérilité.

Synthèse Bibliographique

Le pourcentage des formes typiques et atypiques est dénombré selon la classification de David (2010).

La lecture de la morphologie est effectuée sur 100 spermatozoïdes au grossissement à l'immersion (100X) (**Figure 6**).

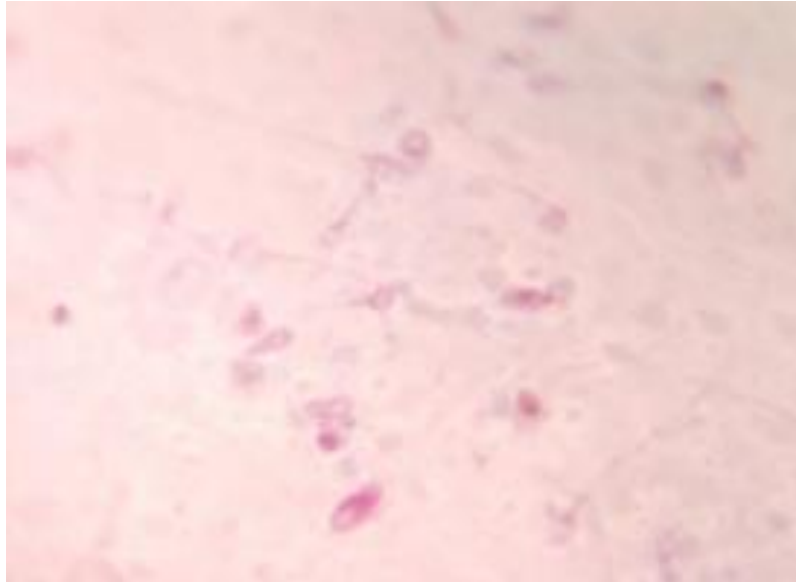


Figure 6 : Forme atypique des spermatozoïdes vue sous microscope optique (G \times 100).

4.4. Biochimie du plasma séminal

L'exploration biochimique du sperme humain est fondée sur les dosages de certains composés de l'éjaculat. Ceux-ci sont sécrétés par les glandes annexes. L'étude biochimique du sperme doit être envisagée lorsque le spermogramme met en évidence :

- Les anomalies du volume, pH, viscosité. Les marqueurs des différentes glandes sont à mesurer pour évaluer l'importance de l'atteinte de ces glandes ;
- En cas d'azoospermie si la mesure de l'alpha-glucosidase se trouve effondrée, le diagnostic d'une azoospermie excrétoire peut être posé (Fenichelp et al., 1999).

La biochimie du liquide séminal doit rester un outil d'exploration andrologique dans le cadre du bilan de l'infertilité masculine, à condition de décider avec soin et précision la prescription de ces examens, et d'en connaître les limites d'interprétation des résultats.

III. Biomarqueurs

1. Définition

Biomarqueur (abréviation de marqueur biologique) : c'est une molécule biologique qui peut être détectée dans un tissu ou un fluide biologique (ex : sang, urine...) (Romanetto J, 2011), qui est le reflet d'un processus normal ou pathologique, ou d'une condition, ou d'une maladie. Un biomarqueur peut être utilisé pour suivre l'évolution de la réponse à un traitement pour une pathologie donnée ou un état. Ils sont également nommés marqueurs moléculaires ou molécules signatures (Besson D, 2013).

2. Différents types de biomarqueurs

2.1. Classification des biomarqueurs selon leur nature biochimique ou la technique ayant permis de développer le biomarqueur

En fonction de la nature du biomarqueur recherché, peuvent être appliquées des techniques de génomique, de transcriptomique, de protéomique ou de métabolomique. De ce fait, on parle de biomarqueurs génomiques fondés sur l'ADN, de biomarqueurs transcriptomiques fondés sur l'ARNm, de biomarqueurs protéomiques fondés sur les protéines ou de biomarqueurs métabolomiques pour les métabolites (**tableau 04**).

Tableau 4: comparaison des techniques de découverte des biomarqueurs usuelles (Scaros O, Fisler R, 2005).

	Biomarqueur génomique	Biomarqueur transcriptomique	Biomarqueur protéomique	Biomarqueur métabolomique
Technique à bas débit	Technique de séquençage	PCR Northern blot		RMN Chromatographie en phase gazeuse
Technique à moyen débit	Spectrométrie de masse	SAGE	Spectrométrie de masse ELISA	Chromatographie Liquide/Spectrométrie de Masse
Technique à haut débit	PCR	Puce à ADN	Puce à protéines Puce à anticorps	

Synthèse bibliographique

2.2. Classification des biomarqueurs par catégorie selon les autorités de Santé

L'autorité de sante américaine a établi, dès 2005, différents « statuts réglementaires » pour les biomarqueurs (**Figure 7**). Selon ces statuts, certains peuvent être qualifiés de « simples » biomarqueurs exploratoires, d'autres peuvent être qualifiés de « critère de substitution ». La principale différence entre les deux réside dans le niveau de validation (Marrer. E, 2007).

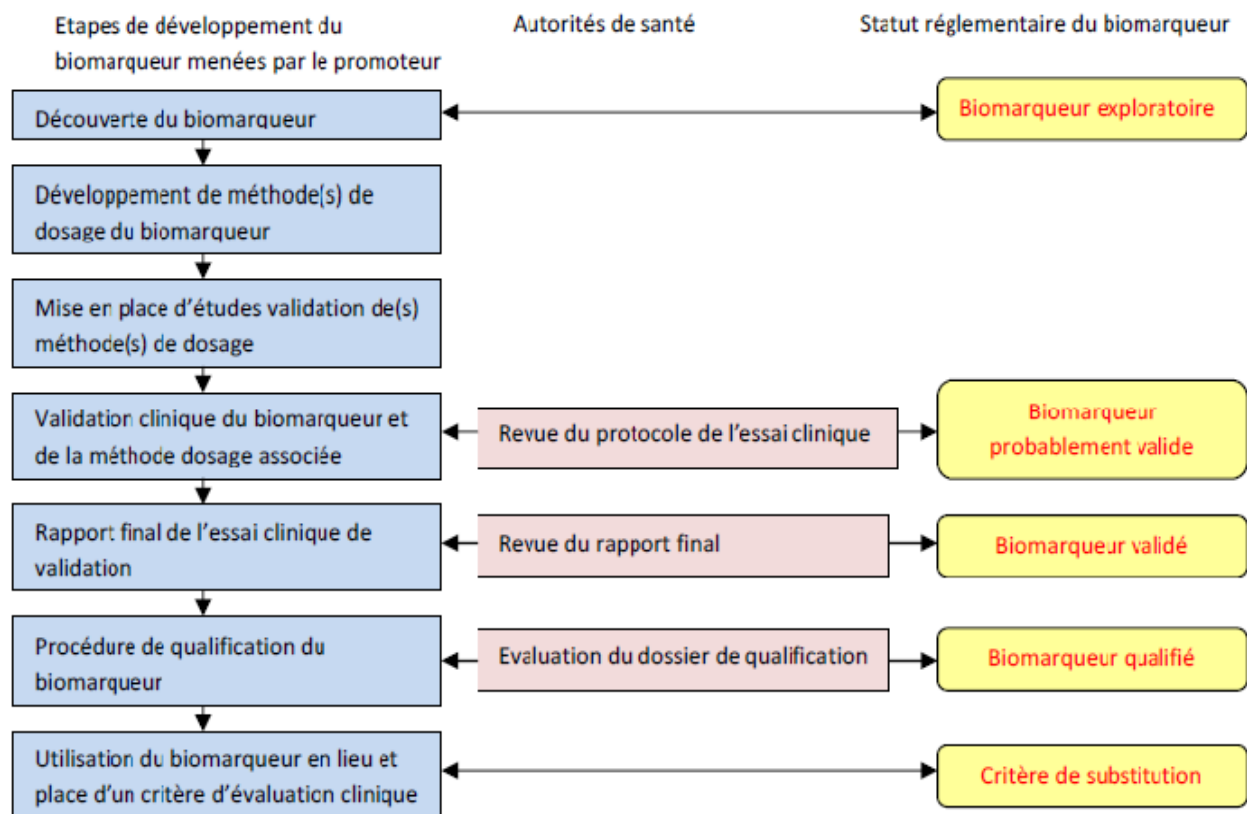


Figure 7: Différents statuts réglementaires d'un biomarqueur relatifs aux étapes du processus de qualification (Marrer. E,2007).

2.3. Classification des biomarqueurs selon leurs fonctions

Il est également possible de classer les biomarqueurs selon les différents types d'objectifs poursuivis :

2.3.1. Biomarqueurs physiopathologiques et biomarqueurs de diagnostic

Les biomarqueurs physiopathologiques ont pour objectif d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques permettant l'approfondissement de la connaissance des mécanismes physiopathologiques et permettant de diagnostiquer les patients atteints de la pathologie étudiée (Romanetto J, 2011).

Synthèse bibliographique

2.3.2. Biomarqueurs pronostiques

Les biomarqueurs pronostiques ont pour objectif de déterminer l'évolution prévisible de la maladie et le niveau de risque qui y est associé pour le patient (Fraser GA, Meyer RM, 2007).

2.3.3. Biomarqueurs prédictifs

Les biomarqueurs prédictifs ont pour objectif de différencier les patients qui sont plus ou moins à même réponse à un traitement. En conséquence, lorsque plusieurs options thérapeutiques sont disponibles, les biomarqueurs prédictifs permettent de déterminer le traitement le plus bénéfique à chaque patient (Fraser GA et Meyer RM., 2007 ; McShane LM et al., 2009).

2.4. Classification des biomarqueurs selon la nature de la variable mesurée par la méthode de dosage du biomarqueur

Enfin, il est possible de classer les biomarqueurs selon la nature de la variable mesurée par la méthode de dosage du biomarqueur : biomarqueur quantitatif, biomarqueur quantitatif relatif, biomarqueur quasi-quantitatif, biomarqueur qualitatif. C'est une donnée importante pour la conduite du processus de validation (Romanetto J, 2011).

3. Validation et méthode de dosage du biomarqueur

Une fois les candidats biomarqueurs identifiés, leur pertinence clinique doit être démontrée, ainsi que leur capacité à être mesurés ou analysés de manière reproductible et robuste. La validation de la méthode de dosage ou d'évaluation est une étape critique dans le développement d'un biomarqueur. Le développement d'un biomarqueur peut échouer en phase clinique, non pas pour des raisons scientifiques mais à cause d'un mauvais choix de la méthode de dosage du biomarqueur ou de la validation insuffisante de la méthode de dosage du biomarqueur utilisée (Cummings J et al., 2010). L'Association Américaine des Sciences Pharmaceutiques (AAPS) ont tenté d'établir ce que pourraient être les étapes de validation d'un biomarqueur et de sa méthode de dosage (**Figure 8**) et ont développé le concept de méthode de validation adaptée (Cummings J et al., 2008).

Synthèse bibliographique

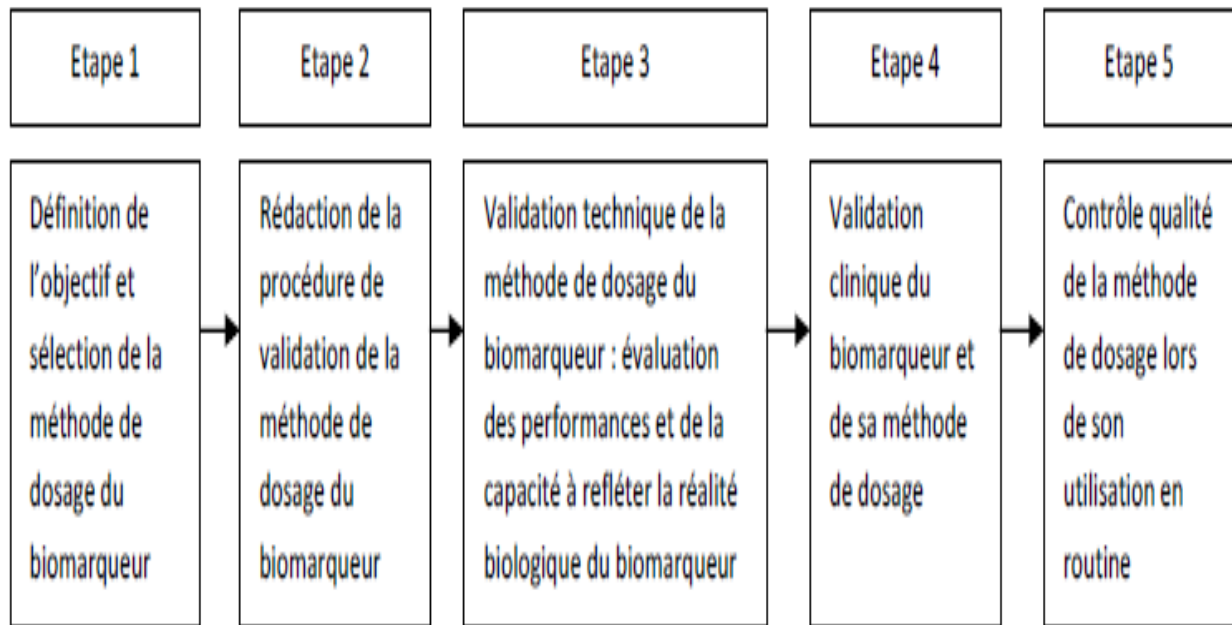


Figure 8: Etapes du processus de validation d'un biomarqueur et de la méthode de dosage associée (Cummings J et al.,2008).

4. Les biomarqueurs séminaux

4.1. Les marqueurs biochimiques séminaux

Le dosage des marqueurs séminaux, quantifiés par éjaculat permet de préciser le niveau d'une obstruction en cas d'azoospermie, la topographie et l'évolution sous traitement d'une atteinte infectieuse et/ou inflammatoire du tractus génital (Rowe et al., 2002).

La détermination des marqueurs biochimiques du sperme est particulièrement intéressante dans les cas d'azoospermie excrétoire à taux de FSH normal, afin d'établir et de localiser une éventuelle obstruction sur le trajet éjaculatoire. Ainsi en fonction du niveau de l'obstruction, ou de certaines pathologies endocriniennes, métaboliques, on peut schématiser les principales variations de ces paramètres comme suit :

Tableau 5: signification des taux des marqueurs biochimiques (Fenichelp et al.,1999).

TYPES D'ANOMALIES	LES MARQUEURS BIOCHIMIQUES		
	Marqueurs Épididymaires	Marqueurs Des vésicules séminales	Marqueurs Prostatiques
	Carnitine α 1-4 glucosidase (glycérophosphocholine)	Fructose	Citrate Zinc Phosphatases acides
Obstruction épидидymaire/du déférent	Taux diminué (sauf si l'obstruction au niveau de la tête épидидymaire)	Taux normal	Taux normal
Obstruction bilatérale du carrefour Vésiculo déférentielle, absence bilatérale des déférents(mucoviscidose)	Taux diminué	Taux effondré	Taux normal
Obstruction au niveau des canaux éjaculateurs	Taux diminué	Taux diminué	Taux normal
Vésiculite (inflammatoire/infectieuse)		Taux diminué	
Hypoandrogénie du syndrome de Klinefelter, lésions testiculaires, hypogonadisme primaire	Taux diminué	Taux diminué	Taux diminué
Diabète sucré		Taux élevé	
Prostatite			Taux diminué

Synthèse bibliographique

- Les marqueurs des vésicules séminales et de la prostate permettent de localiser l'occlusion sur le tractus génital et d'établir aussi une cartographie fonctionnelle du tractus mâle.
- L'agénésie vésiculo-déférentielle et/ou l'obstruction des canaux éjaculateurs se caractérisent par un volume spermatique réduit, pH acide, une chute du taux de fructose. Un taux élevé d'acide citrique montre la participation prédominante de la prostate.
- Un taux bas du marqueur prostatique signe généralement une infection et/ou une inflammation de la prostate, qui peut altérer la mobilité des spermatozoïdes.
- Quant au marqueur épидидymaire, il permet de déceler une azoospermie excrétoire (taux bas du marqueur), d'une azoospermie sécrétoire (taux normal du marqueur). Mais dans certains cas d'azoospermie sécrétoire liée à une orchépididymite avec des lésions mixtes (testiculo-épididymaire), ou un syndrome de *KLINFELTER* on peut trouver un taux bas de ce marqueur (Soufir 1983).

4.2. Les biomarqueurs protéiques d'azoospermie dans le plasma séminal

Plusieurs protéines ont été détectées dans le liquide séminal certaines entre elles ont été proposées comme des biomarqueurs ; les plus fréquentes : l'inhibine b et l'hormone antimüllérienne (AMH) (**Tableau 6**), ainsi les protéines de plasma séminal TEX101 et ECM1 ont récemment été proposées pour le diagnostic différentiel des formes d'azoospermie et sous types et pour prévision des résultats TESE (**Tableau 7**).

4.2.1. L'inhibine B et AMH

Sont les deux candidates les plus intéressantes et ont été proposées comme marqueurs de la spermatogénèse afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de l'insuffisance spermatique et servir de facteur pronostic avant biopsie testiculaire. Elles répondent aux critères suivants :

- D'origine strictement testiculaire produite soit par la cellule de Sertoli soit par les cellules germinales.
- Disparaître après vasectomie.
- Présente une concentration détectable dans le liquide séminal.

Synthèse bibliographique

Tableau 6: caractéristiques des marqueurs étudiés (Duvilla. E et al.,2006).

Caractéristique	Inhibine B	AMH
Structure	Glycoprotéine hétérodimérique 2 sous-unités de 18 KD et 14 KD	Glycoprotéine dimérique 2 monomères de 72 KD
Sécrétion	Cellules de Sertoli et cellules germinales	Cellules de Sertoli
Concentration Dans plasma séminal	1592-10425 pmol/l	3-340 pmol/l
Variation/âge	Elevé chez nouveau-né, puis diminue jusqu'à la puberté et augmente après la puberté	Elevé chez fœtus jusqu'à la puberté Diminue après la puberté
Variation/pathologie	Diminué chez les hommes azoospermies	Diminué en cas d'azoospermie sécrétoire, et devient indétectable en cas d'azoospermie obstructive
Fonction	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Marqueur de la spermatogenèse ✓ Indicateur du niveau d'interruption de la spermatogenèse chez les hommes atteints d'azoospermie non obstructive 	Marqueur de la spermatogenèse
	L'intérêt de ces deux marqueurs comme facteurs prédictifs de la biopsie testiculaire dans les cas d'azoospermie non obstructive reste limité.	

4.2.2. TEX101 et ECM1

Des protéines spécifiques à l'épididyme émergeraient comme biomarqueurs pour la différenciation entre NOA et OA. ECM1, une protéine sécrétée dans le sperme principalement par l'épididyme soutient cette hypothèse. De même, des protéines ayant une expression spécifique dans les testicules, telles que TEX101, émergeraient en tant que biomarqueurs pour la prédiction du résultat de l'extraction des spermatozoïdes testiculaires TESE et la différenciation entre les sous-types NOA, d'hypo spermatogenèse, d'arrêt de maturation et de syndrome cellulaire de Sertoli (Drabovich AP et al., 2013).

Synthèse bibliographique

Dans une recherche de biomarqueurs de l'azoospermie, des études protéomiques récentes ont également mis en évidence des milliers de sperme et de protéines plasmatiques séminales. Certains biomarqueurs protéiques, tels que PTGDS, ACRV1, LGALS3BP, ECM1, et TEX101 ont été vérifiés et validés (**Tableau 07**) (Jared M Bieniek et al., 2016).

Tableau 7: Différenciation des étiologies de l'azoospermie avec les biomarqueurs protéiques à base de plasma séminal (Jared M Bieniek et al., 2016).

Diagnostic avec un test positif	Biomarqueur	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Seuil
Normozoospermie (contre azoospermie)	TEX101	100	100	> 120 ng par ml
	LDHC	100	100	> 160 ng par ml
	ACRV1	93	97	Test positif
NOA (contre OA)	ECM1	100	73	> 2,3 µg par ml
	PTGDS	28.6	50	> 100 ng par ml
Hypo spermatogenèse (contre sertoli uniquement cellulaire)	TEX101	67	100	> 5 ng par ml
Arrêt de maturation (contre sertoli uniquement cellulaire)	TEX101	54	100	> 5 ng par ml
Résultat TESE favorable dans NOA	LGALS3BP	45	100	> 153 ng par ml

5. Rôle des biomarqueurs séminaux

Ils peuvent être utilisés comme un outil de diagnostic pour l'identification des patients qui ont une condition anormale, un outil pour quantifier l'importance de la maladie, un indicateur pronostique, ou pour la prédiction et la surveillance de la réponse à une intervention, et aussi à éviter le besoin de tests plus invasifs.

La recherche et l'identification de biomarqueurs de qualité du spermatozoïde apparaissent comme les enjeux fondamentaux dans le contexte de la fertilité masculine. Ces marqueurs permettront d'affiner l'analyse du sperme, et plus largement, d'améliorer la prise du couple en Procréation Médicalement.

I. Matériel

1. Matériel biologique

1.1. Recrutement des patients

Notre étude a porté sur 14 patients ayant une infertilité masculine plus précisément une azoospermie provenant au centre de procréation médicalement assisté (PMA) de la clinique Ibn Rochd, Constantine. Les patients recrutés sont âgés entre 30 et 50 ans. Cette population a été comparée à un sujet sain sans pathologie connues. Dans tous les cas les patients sont destinés à la clinique par leur médecin traitant pour diagnostic d'infertilité, pour un bilan lors d'une atteinte de l'appareil génital male ou pour un examen de contrôle.

Notre étude a été réalisé sur une période étalée du mois de Février au mois de Mars dans le Laboratoire de Génétique biochimie et Biotechnologies Végétales université frères Mentouri Constantine 1.

Les patients qui ont été retenus dans cette étude répondaient aux critères suivants :

✓ Critères d'inclusion

Tous les patients consentants, mariés depuis plus d'un an, dirigés pour un diagnostic d'infertilité masculine recrutés pour le recours à l'une des techniques de PMA.

✓ Critères d'exclusion

Les patients âgés plus de 65 ans, les patients non consentants sont exclus de notre étude.

1.2. Paramètres étudiés

A travers un questionnaire (**Annexe1**), chaque patient a été interrogé sur les paramètres suivants :

1.2.1. Paramètres épidémiologiques

- **L'âge** : est déterminé pour le patient et sa conjointe.
- **La profession** : chaque patient doit préciser sa profession.
- **Les facteurs modes de vie** : Le statut tabagique (fumeur, non-fumeur, nombre de cigarettes fumées par jour ou un ancien fumeur et depuis combien de temps), la consommation d'alcool (consommation modérée ou excessive), les bains chauds (combien de fois par semaine).
- **Exposition à la chaleur** : Tout patient est interrogé s'il est exposé à des températures élevées dans leur milieu de travail.

Matériels et méthodes

- **Activité physique** : Le but est de savoir si le patient pratique régulièrement le sport, quel type de sport, rarement, en arrêt d'activité ou ne pratique pas de sport.

1.2.2. Paramètres cliniques

- **Type d'infertilité** : primaire ou secondaire.
- **Durée d'infertilité** : pour l'infertilité primaire on cherche à savoir depuis combien d'années il désire un enfant. Pour l'infertilité secondaire combien d'années il n'a pas pu procréer après le dernier enfant.
- **Antécédents urogénitaux** : Antécédents de varicocèle, hydrocèle, ectopie testiculaire, hernie inguinale et s'il a subi des interventions chirurgicales.
- **Antécédents médicaux** : Problème d'HTA, diabète ou autres maladies, s'il a pris des médicaments de quelle nature.
- **Antécédents familiaux** : Frères, cousins et oncles s'ils ont eu des enfants et est-ce que les parents ont eu un problème pour avoir des enfants.

1.3. Le prélèvement de sperme

Tous les échantillons sont collectés entre 8h et 9.30h du matin ; les patients sont informés de certaines instructions concernant le recueil du sperme avant le jour de prélèvement à savoir :

- Une abstinence de trois à quatre jours est recommandée pour éviter le recueil d'un volume diminué d'éjaculat due à un délai d'abstinence plus court ou un volume contenant un dédoublement de numération avec un pourcentage élevé de spermatozoïdes morts due à une abstinence trop longue.
- Le prélèvement se fait au laboratoire et le patient doit être informé sur l'importance de la totalité de l'éjaculat, car une fraction n'est pas représentative de l'ensemble de l'éjaculat.
- Le sperme est recueilli par masturbation dans un récipient stérile avec couvercle contenant le numéro de patient.
- Arrêt de tout traitement susceptible d'avoir une action sur la spermatogénèse.

1.4. L'obtention de liquide séminal

- Centrifugation de sperme à 3000 t/min pendant 10 minutes et puis une congélation du surnageant jusqu'au jour d'utilisation.

Matériels et méthodes

1.1.2. Réalisation de la courbe étalon

La courbe étalon des protéines est établie à partir d'une solution mère d'une protéine standard le sérum albumine bovine (BSA) à 0.1mg/ml dans des tubes à hémolyse.

L'équation utilisée pour calculer les dilutions à effectuer dans l'eau distillée et la solution de Bradford pour un volume final de 10 ml est la suivante :

$$\text{Volume BSA (à prendre)} = [\text{BSA}] \times \text{volume final}$$

Tableau 8: préparation de solutions étalon.

Solutions étalon (mg/ml)	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
Solution mère de BSA (ml) (0.1mg/ml)	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Eau distillée (ml)	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	-

Les points de la gamme à obtenir après dilution sont respectivement : 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg/ml. (**Tableau 8**).

17 tubes ont été préparés et 250ul de chaque échantillon ainsi que la gamme étalon ont été déposés 2.5ul du réactif de Bradford sont rajoutés (nous devons signaler que 4 échantillons sur les 15 analysés n'ont pas été utilisés pour le dosage des protéines à cause de la quantité minimale du liquide séminal qui n'était pas suffisante pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford).

Le contenu des tubes à hémolyse est mélangé à l'aide d'un vortex, puis incubé à l'abri de la lumière à température ambiante pendant quelques minutes.

Avant le dosage, le spectrophotomètre est étalonné par un échantillon Blanc préparé avec 250 µl d'eau et 2,5 ml de réactif Bradford à 595 nm pour le mettre à zéro avant de lire l'ensemble des points de la gamme étalon.

Ainsi les densités optiques (DO) obtenues (**annexe 3**) permettent de tracer une courbe d'étalonnage $DO = f(C)$.

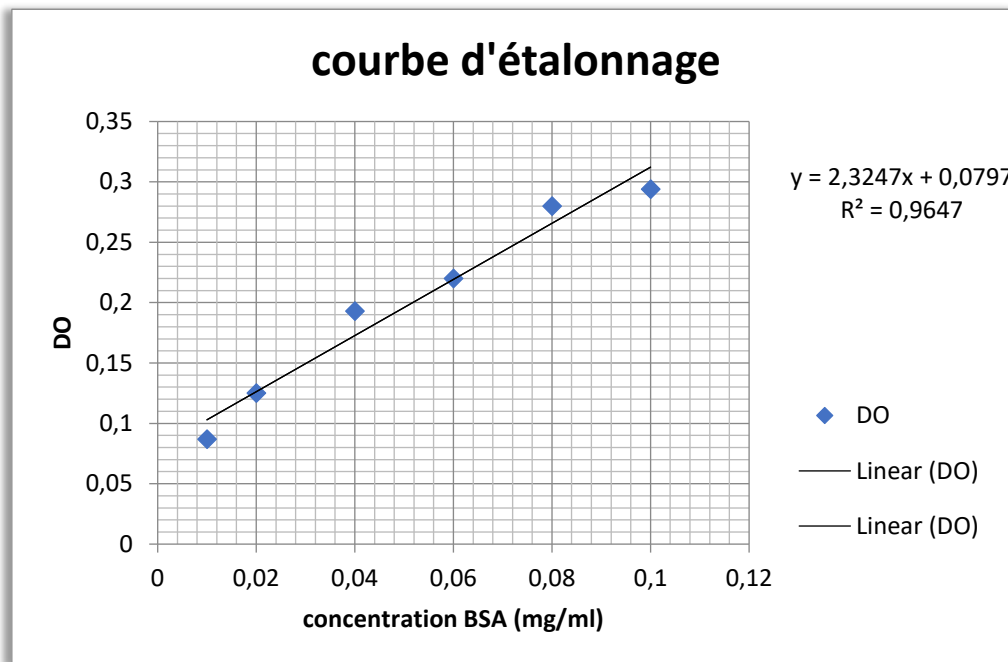


Figure 10: Courbe étalon de dosage des protéines par la méthode de Bradford et al., 1976.

L'analyse spectrophotométrique des échantillons permet de déterminer la concentration exacte des protéines contenues dans chaque Eppendorf contenant un extrait protéique (**annexe 4**). Cette dernière est obtenue en déterminant graphiquement l'équation de la courbe standard qui est de : $y=2.3247x+0.0797$

De ce fait le calcul des concentrations protéiques des échantillons est de :

$$\text{Concentration protéine (x)} = (\text{absorbance (y)} - 0.0797) / 2.3247$$

2. Extraction des protéines séminales dans des conditions dénaturantes et réductrices

L'extraction des protéines a été réalisée à partir du liquide séminal des patients infertiles atteints d'azoospermie et de sujet sain dans des conditions dénaturantes et réductrices. 100 μ l de plasma séminal des patients infertiles et des sujets sains sont mélangés avec 50 μ l de solution d'extraction contenant 35% (v/v) de glycérol, 22% (v/v) de Tris/HCL 1M pH 6.8, 43% (v/v) d'eau distillée, 7% (p/v) de SDS et quelques grains de bleu de bromophénol. 2.5% (v/v) de β -mercaptoethanol sont rajoutés au mélange pour réduire les protéines séminales. Après agitation pendant 1 heure à température ambiante, les mélanges sont incubés à 65°C pendant 30 minutes puis centrifugés à 10 000 t/min pendant 1 minute. Les surnageants contenant les protéines du liquide séminal dissociées et réduites sont récupérés et utilisés immédiatement.

Matériels et méthodes

3. Électrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide

La technique d'électrophorèse utilisée est celle décrite par LAEMMLI (1971) et modifiée par SINGH (1991). La composition protéique est caractérisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide de 1,5 mm d'épaisseur en conditions dénaturantes (présence de SDS), avec un système vertical. Le gel de séparation contient 12,56% de polyacrylamide et le gel d'alignement 2,88% (**annexe 2**). Les échantillons (liquide séminal) sont déposés à raison de 50 µl par puits. La migration est effectuée dans les conditions de jour à 40 mA et 120 V par gel dans un tampon Tris 25 mM pH 8,3 contenant 1,4 % (p/v) de glycine et 0,1% (p/v) de SDS.

4. Révélation des bandes protéiques après migration électrophorétique

4.1. Coloration

La façon la plus simple de visualiser les bandes de migration des protéines est de les colorer. Le gel est immergé une nuit dans la solution de coloration, contenant du Bleu de Coomassie à 12% (p/v) de TCA et 5 % (v/v) de solution mère de Bleu de Coomassie R250 à 1 % dans l'éthanol.

4.2. Décoloration

Après une nuit, le gel est transféré dans une solution acétique contenant l'acide acétique du méthanol et de l'eau distillée avec des proportions (2.1.1) respectivement. Pour enlever l'excès de colorant qui a diffusé dans le gel et empêche de voir les bandes de protéines. A la fin de cette décoloration, on obtient un gel transparent avec les bandes de protéines colorées en bleu.

5. Lecture des électrophoregrammes

La lecture des diagrammes consiste à relever la mobilité de chacune des bandes présentes en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation et de déterminer le poids moléculaire de chaque protéine.

6. Analyse statistique

Le traitement des données d'électrophorèse a fait appel à des méthodes statistiques, les fréquences et les indices de similarités ont été effectués à l'aide d'Excel 2016. L'établissement des dendrogrammes est réalisé à l'aide du logiciel statistica version 6.0.

I. Données épidémiologiques

Les tableaux et les figures suivants représentent l'échantillon d'étude composé de 14 cas de sexe masculin présentant une azoospermie. Nous avons réparti ce nombre de patients selon plusieurs critères.

1. Répartition des patients selon l'âge

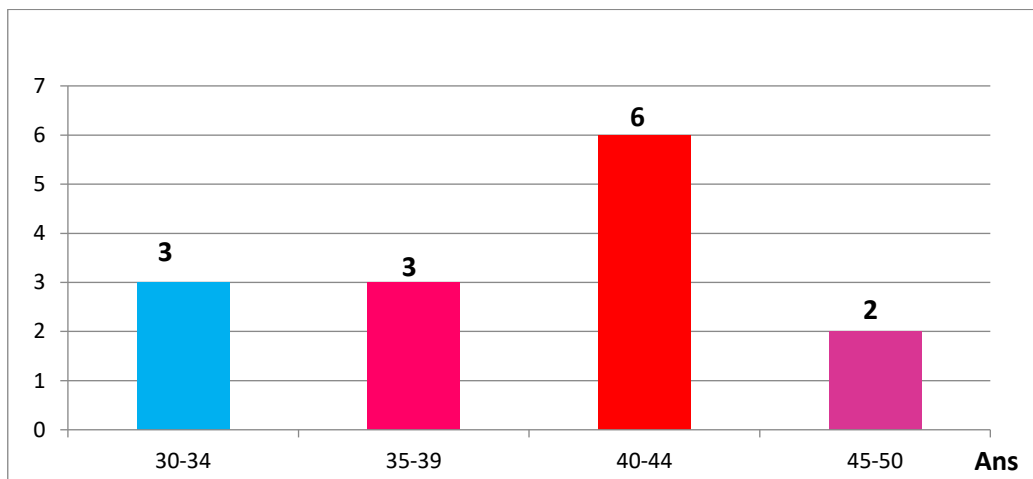


Figure 11: Répartition des patients en fonction de l'âge.

L'âge moyen des patients est 39,4 ans avec des extrêmes allant de 30 ans à 50 ans. La répartition des patients par tranche d'âge, indique une prédominance de cette pathologie dans la tranche d'âge [40-44] ans (figure 11).

2. Répartition des patients selon les wilayas

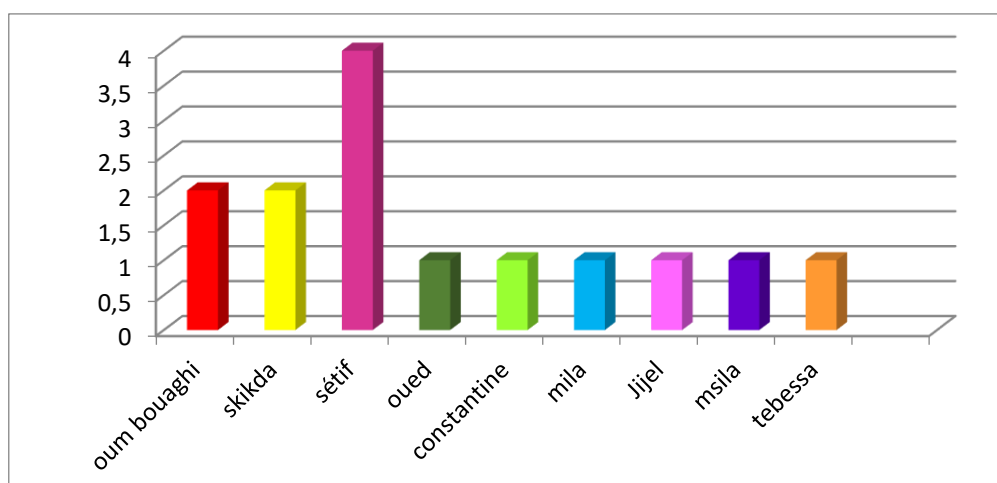


Figure 12: Répartition des patients selon les wilayas.

Résultats et discussion

Selon les régions géographiques, la wilaya de Sétif représente le taux le plus élevé des patients consultant pour une infertilité masculine avec 4 cas, suivie par la wilaya de Skikda et Oum bouaghi avec 2 cas pour chacune (**figure 12**).

3. Répartition des patients selon les types d'infertilité

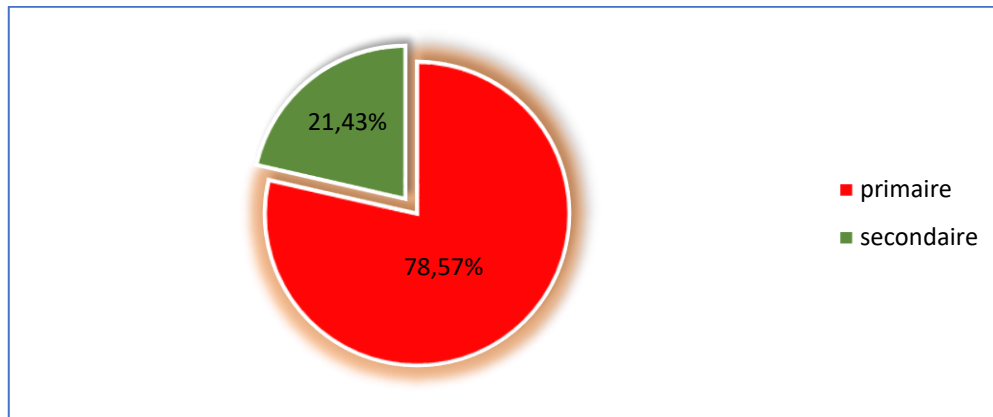


Figure 13: Répartition des patients selon les types d'infertilité.

Nous observons un taux élevé des cas consultants pour une infertilité primaire (78.57%) par rapport au taux des infertilités secondaires (21.43%) (**figure 13**). Ce résultat peut s'expliquer par le contexte social et la tendance qu'auraient les couples n'ayant pas d'enfant à consulter plus souvent que les autres pour traiter leur infertilité. Des études menées en Algérie, dans la région d'Annaba, indiquent des taux d'infertilité primaire et secondaire respectivement de 73,48 % et de 26,52% (Daroui, 2001). En France ces taux sont respectivement de 67 % et 33 % (Thonneau et al., 1991).

4. Répartition des deux types d'infertilité en fonction de l'âge

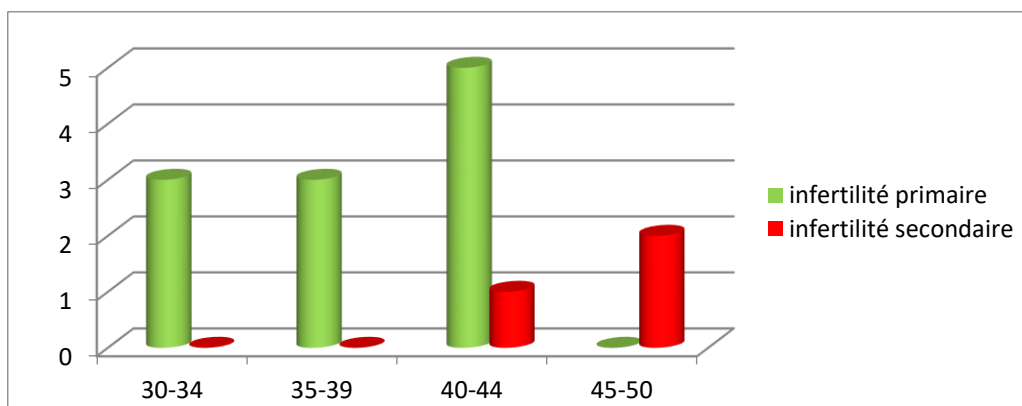


Figure 14: Répartition des deux types d'infertilité en fonction de l'âge.

Résultats et discussion

Les résultats liés à l'âge de la population étudiée indiquent que les patients les plus touchés par l'infertilité primaire se situent dans la tranche d'âge de 40-44 ans avec 5 cas, tandis que ceux présentant une infertilité secondaire sont de 45-50 ans avec 2 cas (**figure 14**).

5. Répartition des patients selon la profession

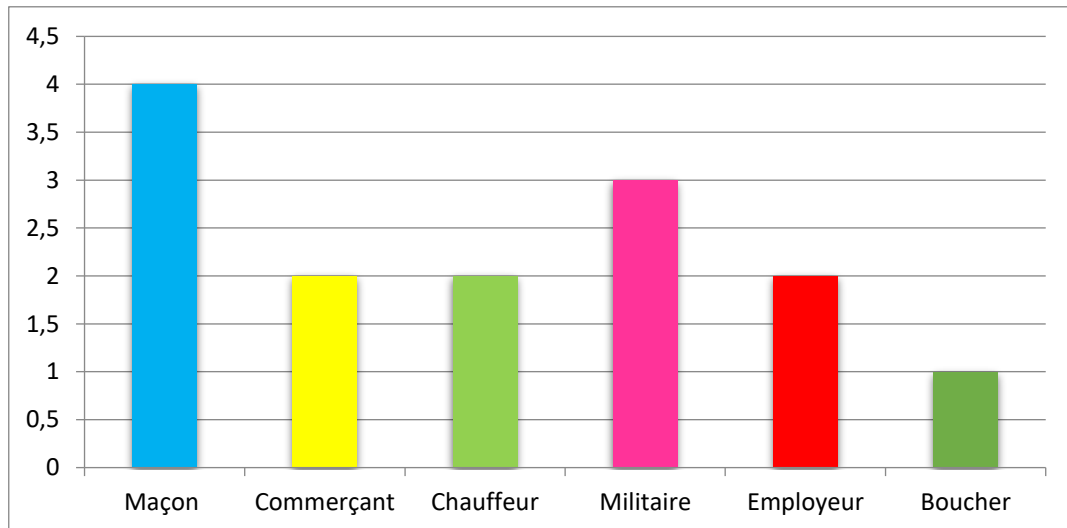


Figure 15: Répartition des patients selon la profession.

La figure 15 démontre que : les maçons représentent la catégorie la plus élevée avec 4 cas, suivis par 3 militaires et 2 dans le secteur commercial, 2 chauffeurs et 2 employeurs. Le métier du boucher est représenté par un seul cas.

6. Répartition des patients selon les antécédents Pathologiques

Tableau 9: Répartition des patients selon les antécédents pathologiques.

Antécédents	Effectifs
Sans antécédents	4
Médicaux	12
Familiaux	2
Urogénitaux	5

Résultats et discussion

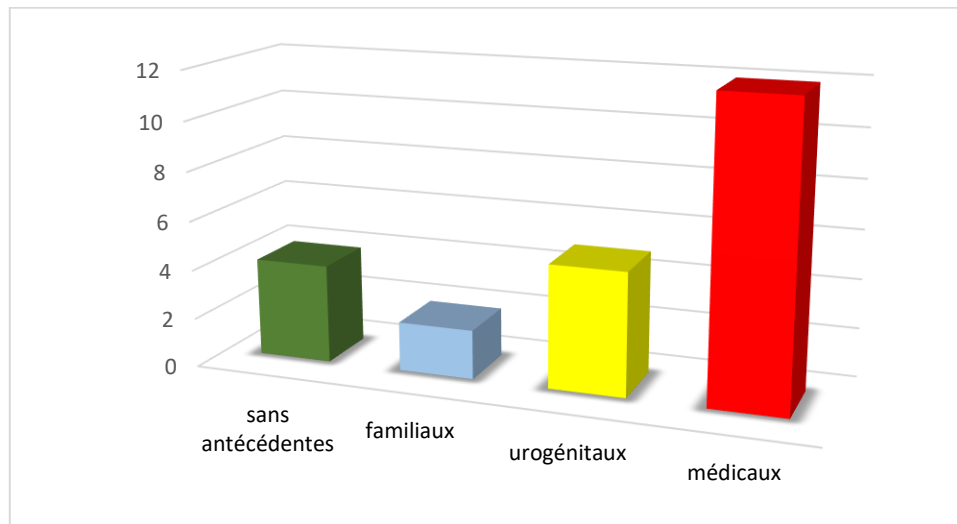


Figure 16: Répartition des patients selon les antécédents pathologiques.

La figure 16 et le tableau 9 montrent une prédominance des antécédents médicaux chez les patients infertiles avec 12 cas; suivi par les antécédents urogénitaux avec 5 cas et en fin les antécédents familiaux avec 2 cas; alors que 4 cas n'ont aucun antécédent.

7. Répartition des patients selon les pathologies associées

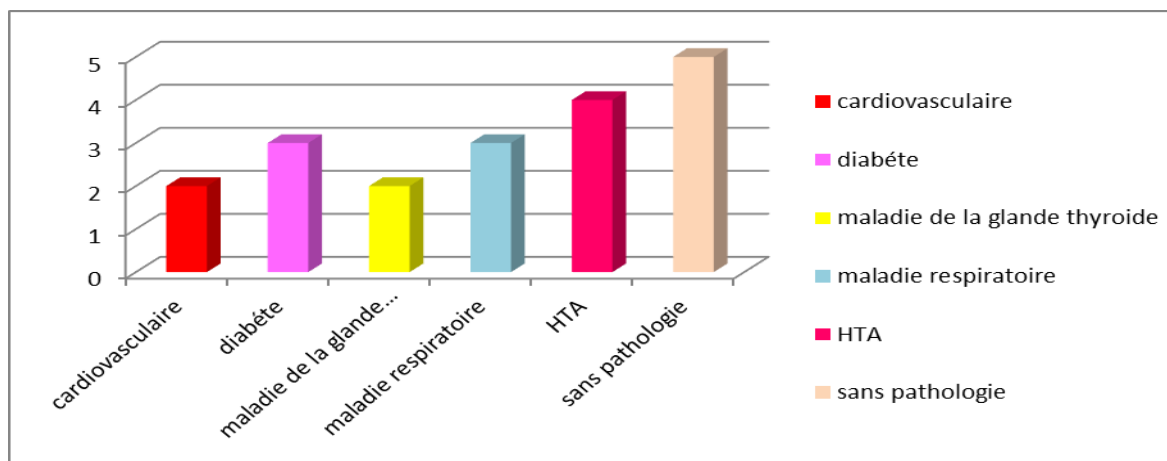


Figure 17: Répartition des patients selon les pathologies associées.

Selon les résultats représentés dans la figure 17, nous avons noté que 5 des patients sont sans pathologies associées, 4 des cas souffrent d HTA, 3 cas sont des diabétiques et souffrent de maladies respiratoires et 2 cas souffrent de maladie cardiovasculaire et maladie de la glande thyroïde. Ces pathologies associées sont en fait des maladies qui augmentent avec l'âge, mais elles sont surtout liées au mode de vie.

8. Répartition des patients selon les habitudes de vie toxiques

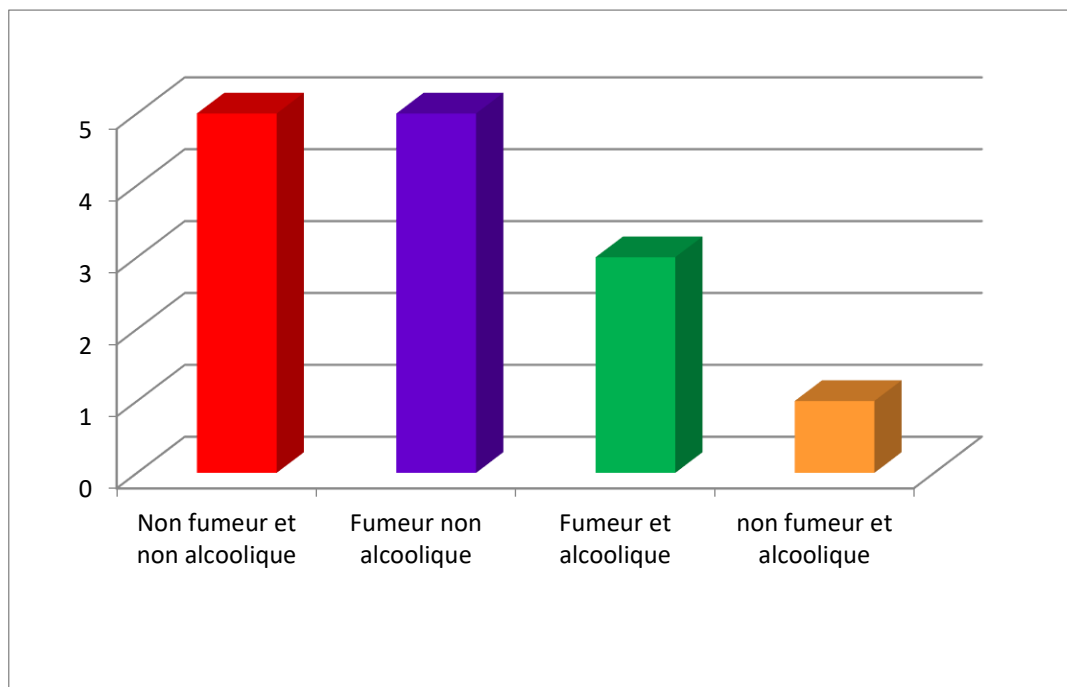


Figure 18: Répartition des cas en fonction des habitudes de vie toxique.

La figure 18 montre que 5 des patients sont non-fumeurs et non alcooliques, 5 des cas sont des fumeurs non alcooliques. 3 sont des fumeurs et alcooliques et un seul cas non-fumeur et alcoolique.

9. Répartition des patients en fonction des bains chauds

Tableau 10: Répartition des patients en fonction des bains chauds.

Les bains chauds	Effectifs
Non	8
Oui	6
Total	14

D'après les résultats représentés dans le tableau 10, nous avons noté que 6 des patients ont indiqué prendre régulièrement des bains chauds contre 8 qui en prennent rarement ou jamais.

10. Répartition des patients selon l'âge et l'IMC

Tableau 11: Distribution des patients selon l'âge et l'IMC.

L'âge	IMC			Total
	Normal	Surpoids	Obésité	
30-34	2	0	1	3
35-39	0	1	2	3
40-44	5	1	0	6
45-50	0	1	1	2
Total	7	3	4	14

Le tableau 11 montre que :

- Les tranches d'âge les plus touchées par l'obésité sont de 35 à 39 ans avec un effectif de 2 cas.
- Il y a 3 cas de nos patients qui sont en surpoids dans la tranche d'âge de 35 à 39 ans, 40-44 ans et 45-50 ans.
- Il y a 7 cas qui présentent un IMC normal avec un effectif de 5 patients appartenant à la tranche d'âge de 40 à 44 ans.

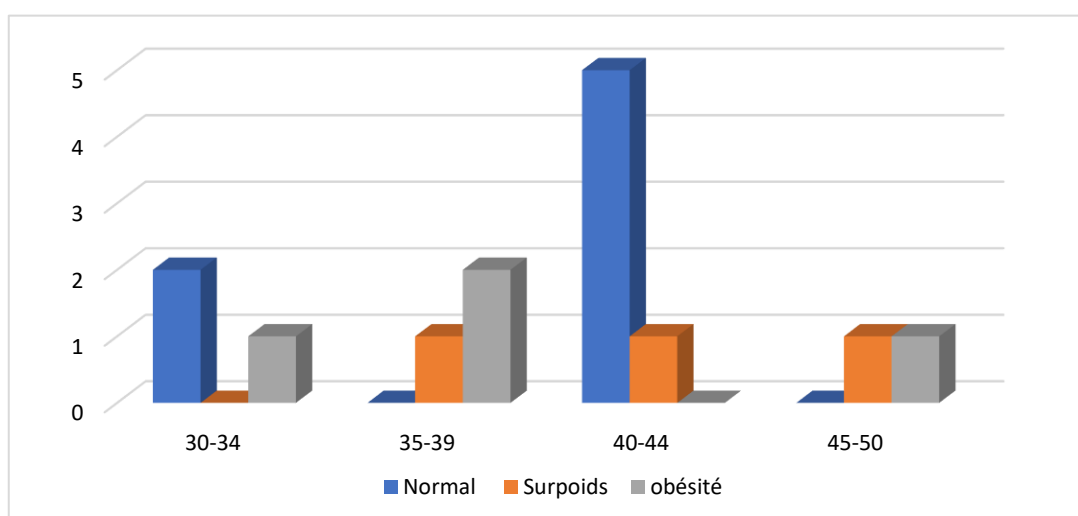


Figure 19: Histogramme de distribution des patients selon l'âge et selon l'IMC

II. Analyse du taux de protéines dans le liquide séminal des patients

La concentration en protéines dans le liquide séminal des patients analysés ainsi que le témoin est représentée dans les figures 20 et 21

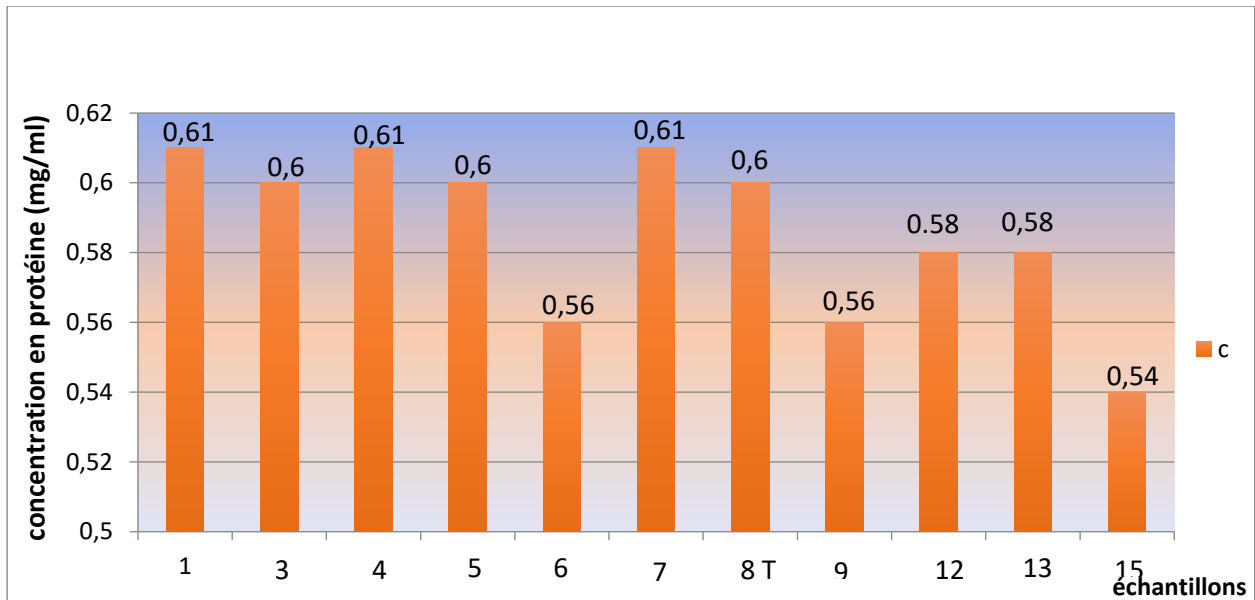


Figure 20: La concentration des protéines séminales de chaque échantillon.

Nous rappelons que 4 échantillons sur les 15 analysés n'ont pas été utilisés pour le dosage des protéines à cause de la quantité minimale du liquide séminal qui n'était pas suffisante pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford.

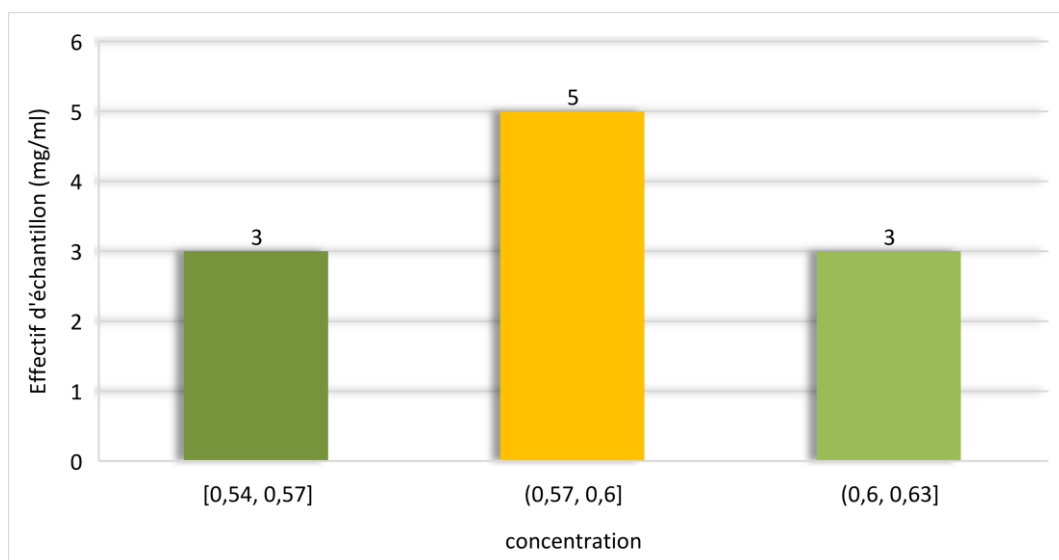


Figure 21: Distribution des échantillons selon la concentration des protéines séminales.

Résultats et discussion

Il est à noter que les concentrations en protéines séminales ont été divisées en trois classes (**figure 21**).

- Classe 1 :]0.54-0.57]mg/ml
- Classe 2 :]0.57-0.60]mg/ml
- Classe 3 :]0.60-0.63]mg/ml

Il ressort de ces résultats que la plupart des patients appartiennent à la classe 2 et présentent une concentration en protéines séminales entre 0.57 mg/ml et 60 mg/ml.

Le taux de protéines séminales dans le groupe analysé varie de 0.54 mg/ml à 0.63 mg/ml. La concentration la plus élevée est notée pour les échantillons 1, 4 et 7. Sur le plan clinique, le patient 1 souffre de maladie respiratoire emphysème pulmonaire, le patient 4 présente une maladie cardiovasculaire alors que le patient 7 est asthmatique et les trois patients ont des problèmes d'HTA. La concentration la plus faible est notée pour l'échantillon 15. Sur le plan clinique, ce patient présente un diabète et une hypothyroïdie ; il a des antécédents de varicocèle et prend des médicaments antidépresseurs.

D'après les résultats présentés dans la figure 21 et sachant que le témoin présente une concentration de 0.6 mg/ml et appartient à la classe 2, nous pouvons constater que trois patients appartenant à la classe 1 présentent des concentrations en protéines séminales inférieures à celle du témoin et qui varient de 0.54 mg/ml à 0.57 mg/ml. Sur le plan clinique ces patients ont des antécédents urogénitaux et ils prennent des antidépresseurs. Nous observons également que 3 patients appartenant à la classe 3 présentent un taux de protéines séminales variant de 0.60 mg/ml à 0.63 mg/ml qui est supérieur à celui du témoin. Sur le plan clinique, ces patients souffrent d'hypertension artérielle (HTA). Et sont des fumeurs pour plus de 15 ans, leur mode de vie est toxique vu la consommation d'alcool et le stress.

III. Fractionnement des protéines séminales et recherche de biomarqueurs

1. Analyse des profils électrophorétiques

L'analyse des profils électrophorétiques, du protéome séminal de témoin et celui des patients, révèle des variations dans la composition protéique.

Résultats et discussion

Cette analyse permet de distinguer 15 bandes protéiques avec des mobilités variantes entre 5 et 109 mm.

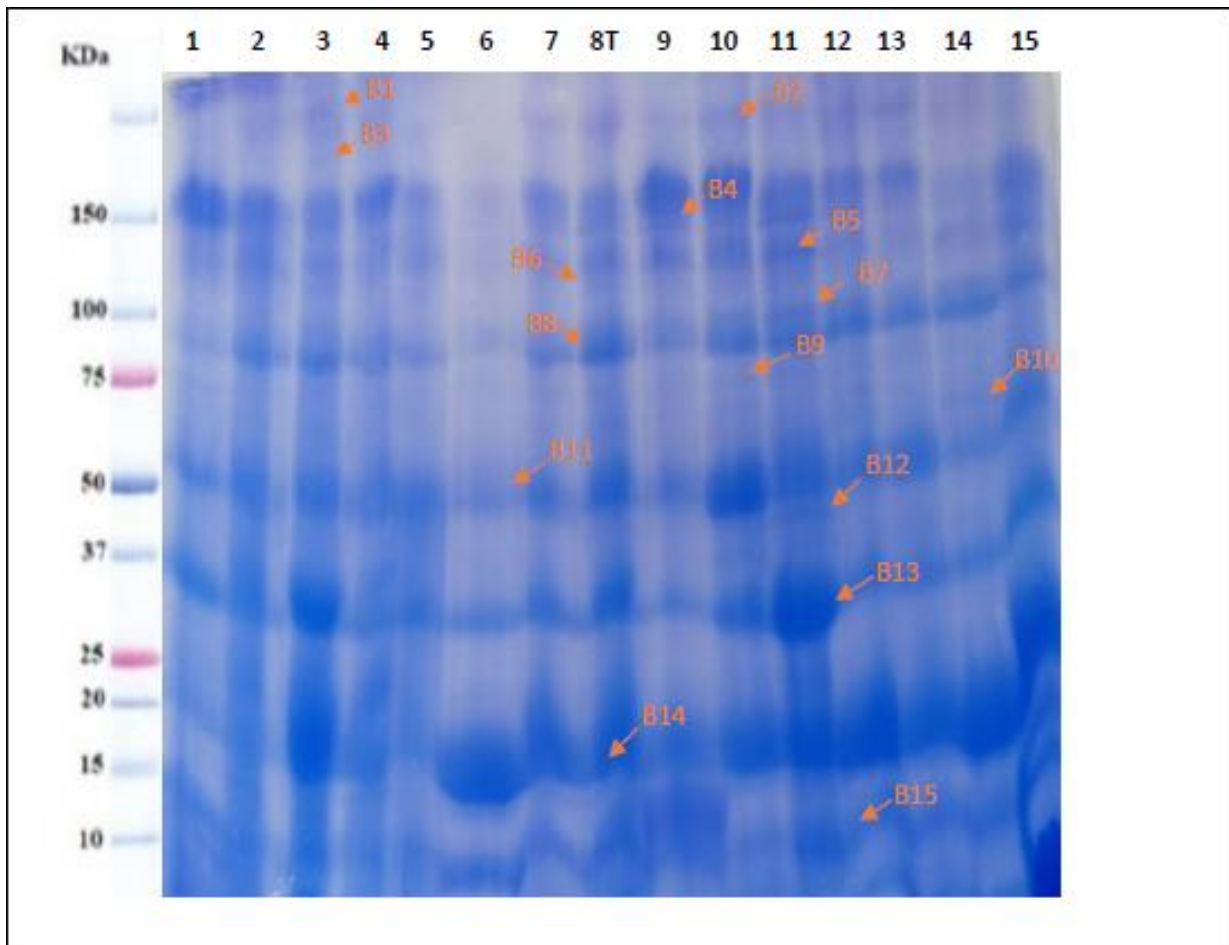


Figure 22: Profils électrophorétiques des protéines séminales dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE. T : témoin. 1,2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,13,14,15 : patients malades.

D'abord, la comparaison entre les profils électrophorétiques de témoin et des sujets malades montre que certaines bandes protéiques présentent des variations quantitatives et/ou qualitatives.

D'après les profils électrophorétiques de témoin et des patients, nous remarquons la présence des biomarqueurs qualitatifs et quantitatifs à la fois comme les bandes B2, B5, B7, B14. A titre d'exemple la bande B2 est fortement concentrée chez le témoin et les patients 10 et 13, elle est moins concentrée chez les patients 3, 4, 7, 9, 11, 12 et faiblement concentrée chez les patients 1, 2, 5, 14, 15 mais elle est absente chez le patient 6. À côté de la bande B2, la bande B5 qui varie quantitativement et qualitativement, elle est fortement concentrée chez le témoin et les patients

Résultats et discussion

9,10 et 11, moins concentrée chez les patients 7, 12 et 15 et faiblement concentrée chez les patients 2 et 3 mais absente chez les patients 1, 4, 5, 6, 13 et 14. Donc les bandes B2 et B5 varient quantitativement et qualitativement ce qui leur confère la propriété de biomarqueurs quantitatifs et qualitatifs à la fois (**figure 22**).

Nous pouvons considérer comme étant des biomarqueurs qualitatifs les bandes B1, B3, B6, B9, B10, B12 qui varient qualitativement. A titre d'exemple la bande B12 qui est absente chez la majorité des malades 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15 mais présente chez le témoin et le patients 11. C'est le cas aussi de la bande b6 qui est présente seulement chez le témoin et le patient 3 et absente chez tous les autres échantillons (**figure 22**).

Nous constatons également des biomarqueurs quantitatifs. Les bandes B4, B8, B11, B13 qui sont omniprésentes mais leur intensité varie d'un échantillon à un autre. A titre d'exemple : la bande B4 où l'intensité de cette bande est forte chez le témoin et les patients 7, 9, 10, 11, 12, 13 tandis que chez les patients : 1, 2, 3, 4, 14, 15 l'intensité est moyenne, par contre chez les patients 5 et 6 il y a une faible intensité.

Quant à la bande B8 elle est fortement présente chez le témoin et moyennement présente chez les autres patients, cependant son intensité est faible seulement chez le patient 6 (**figure 22**).

Ainsi, ces fluctuations observées entre les malades sont probablement dues à des facteurs tels que : les antécédents familiaux, les antécédents urogénitaux et médicaux, l'obésité et les pathologies associées.

En outre, il faut signaler la présence d'un cas particulier, celui du patient 6 qui présente un profil électrophorétique complètement différent (**figure 22**). En effet, ce profil est marqué par l'absence des bandes protéiques B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B10, B12, qu'on retrouve dans les autres échantillons. Sur le plan clinique, ce patient est diabétique, il souffre aussi de maladie respiratoire, il a une ectopie testiculaire son mode de vie est toxique vu qu'il consomme le tabac.

2. Conséquence de l'azoospermie sur le protéome séminal

L'analyse comparative des profils électrophorétiques des protéines séminales extraites des conditions dénaturantes réductrices montre ;

Résultats et discussion

- Deux exemples de protéines exprimées chez le témoin et relativement absentes chez les patients atteints d'une azoospermie ; les bandes B6 et B12 de masses moléculaires approximatives de 120 KDa et 40 KDa, respectivement.

D'après la littérature, ces groupes de protéines peuvent correspondre à certaines protéines du liquide séminal à savoir la céruloplasmine qui a un poids moléculaire d'environ 120 KDa, la somatomedin C ou IGF 1 qui ont un poids moléculaire de 40 KDa. Donc probablement, la disparition de ces protéines, autrement dit l'absence d'expression de céruplasmine et de la somatomedin C dans le milieu séminal chez les patients malades est une des conséquences de l'azoospermie sur le protéome séminal.

- Un autre exemple de protéine exprimée chez le témoin et les patients malades, la bande B8 de masse moléculaire approximative de 79 KDa. Cette protéine montre des variations d'expression quantitatives avec une intensité différente par rapport à celle du témoin. D'après la littérature, les groupes de protéines situées aux environs de 79 KDa et se trouvent dans le liquide séminal, peuvent correspondre à la Transferrine. Probablement, les fluctuations quantitatives de certaines protéines exprimées sont donc une des conséquences d'une azoospermie sur le protéome séminal.

Ces différences d'expression sont autant des facteurs d'intérêt (biomarqueurs) pour l'analyse de l'influence de l'azoospermie sur la composition en protéines séminales, celles-ci étant susceptibles d'être spécifiquement exprimées ou inhibées au cours de cette pathologie.

Ces protéines séminales variantes peuvent être secondairement fractionnées par électrophorèse bidimensionnelle et caractérisées par spectrométrie de masse afin de préciser si elles sont susceptibles d'être considérées comme marqueurs de la maladie.

3. Etablissement des diagrammes types

L'analyse des diagrammes électrophorétiques montre que ces derniers présentent de nettes différences en composition protéique à la fois qualitatives et quantitatives pour les différents patients.

Un tel ensemble de résultats peut être alors exploité en estimant le degré de différence (ou d'analogie) entre les diagrammes des individus considérés deux à deux.

Cette représentation nous permet donc de conserver une image réelle du gel pouvant servir comme base de données pour l'identification.

Résultats et discussion

Nous rapportons dans le tableau ci-dessous le diagramme type des protéines séminales des patients malades et de sujet sain dans des conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS-PAGE (1 : Présence de la bande, 0 : Absence de la bande, T : témoin).

Tableau 12: Matrice binaire des protéines séminales dans des conditions dénaturantes réductrices révélées par SDS-PAGE.

Bandes	Mobilité	Echantillons														
		1	2	3	4	5	6	7	T	9	10	11	12	13	14	15
1	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	15	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	25	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
4	34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	38	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
6	41	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
7	46	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0
8	48	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	59	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
10	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
11	70	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	78	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
13	90	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	97	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	109	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

4. Etude de la variabilité des protéines séminales dénaturées et réduites

L'analyse électrophorétique des 15 échantillons a permis de distinguer 15 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions dénaturantes et réductrices (**tableau 13**).

Tableau 13: Variabilité des protéines séminales

Bandes	Mobilité (mm)	Echantillons (E)	Fréquence (%)
B1	5	E3	6.66
B2	15	E1, E2, E3, E4, E5, E7, T, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15	93.33
B3	25	E3, E12, E13	20
B4	34	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, T, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15	100
B5	38	E2, E3, E7, T, E9, E10, E11, E12, E15	60
B6	41	E3, T	13.33
B7	46	E1, E9, E10, E11, E12, E14	40
B8	48	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, T, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15	100
B9	59	E1, E7, T, E10, E11	33.33
B10	64	E12, E14	13.33
B11	70	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, T, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15	100
B12	78	T, E11	13.33
B13	90	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, T, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15	100
B14	97	E1, E2, E3, E4, E6, E7, T, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15	93.33
B15	109	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, T, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15	100

D'après le tableau ci-dessus, nous constatons une grande variabilité des protéines séminales. L'observation de ces dernières dans l'ordre décroissant des fréquences montre que les bandes 4, 8, 11, 13 et 15 de mobilité 34, 48, 70, 90 et 109 mm, respectivement ont une fréquence maximale de 100 %. Elles constituent les protéines séminales dominantes. Ensuite viennent les bandes 2 et 14 de mobilité 15 et 97 mm, respectivement avec une fréquence importante de 93,33% et sont

Résultats et discussion

présentes chez 14 échantillons. Elles sont suivies par la bande protéique 5 dont la mobilité est de 38 mm qui se trouve moins fréquente que les précédentes avec un taux de 60%. Concernant les bandes 3, 6 et 7, 9, 10, 12 qui ont des mobilités différentes entre 25 et 78 mm ont des fréquences moyennes de 20, 13.33, 40, 33.33, 13.33, 13.33%, respectivement. Enfin, nous retrouvons la bande protéique 1 dont la mobilité est de 5 mm avec une fréquence minimale de 6,66%.

5. Classification hiérarchique des protéines séminales

Les relations entre les différents patients sont établies à partir de leurs ressemblances dans la composition protéique, pour cela, nous avons fait appel à la classification hiérarchique. Les regroupements effectués à chaque pas de l'algorithme de classification hiérarchique rassemble des éléments qui sont plus ou moins proches entre eux.

La représentation sous forme de dendrogramme d'une classification matérialise bien le fait que les classes formées au cours du processus de classification constituent une hiérarchie indiquée de classe partiellement emboîtées les unes dans les autres.

Le dendrogramme des protéines séminales dénaturées et réduites est présenté dans la figure suivante.

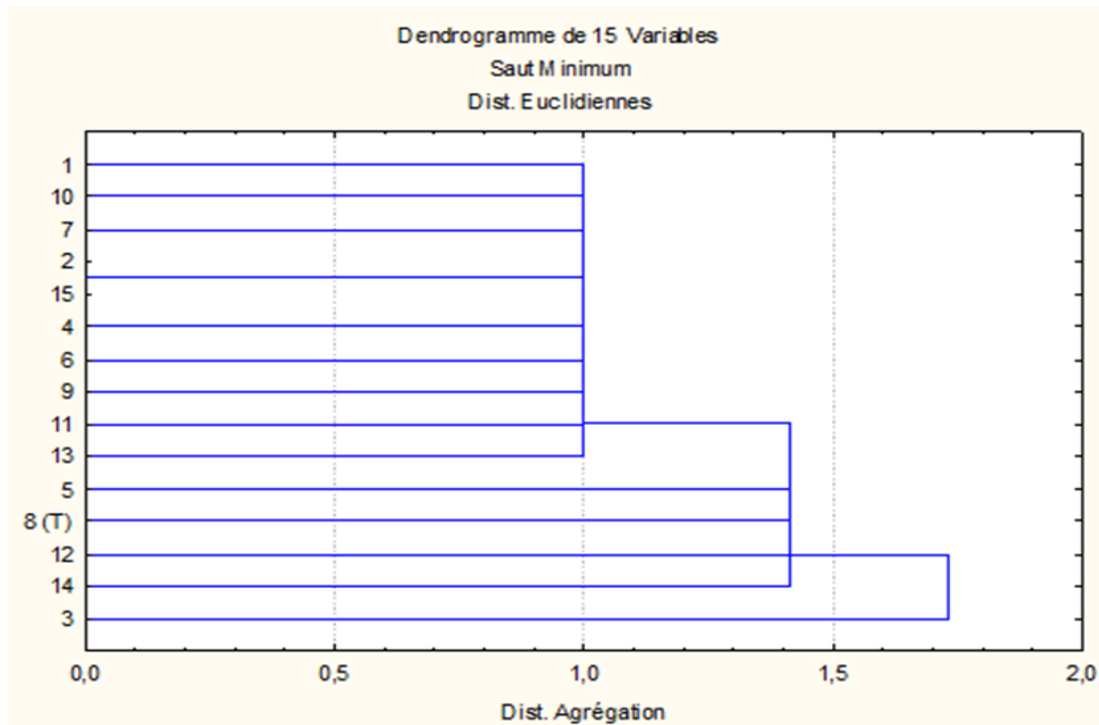


Figure 23: Dendrogramme des 15 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et réductrices fractionnés par SDS/PAGE.

Résultats et discussion

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégations révèle de nombreux groupes permettant d'estimer la ressemblance dans la composition protéique des échantillons (**figure 23**).

A la distance d'agrégation 1.73, l'ensemble des échantillons est divisé en deux principaux groupes. Le premier groupe contient uniquement le patient 3, sur plan clinique Le patient 3 est un homme âgé de 47 ans, obèse, diabétique et a subi une intervention chirurgicale.

Le second groupe est divisé à son tour en cinq sous-groupes à la distance d'agrégation 1,42. Le premier sous-groupe contient uniquement le patient 14 qui constitue un groupe à part, le deuxième sous-groupe comprend le patient 12 uniquement et le troisième sous-groupe contient uniquement le témoin 8 le quatrième sous-groupe contient seulement le patient 5. Donc chacun de ces patients constitue un groupe à part. Le patient 14 est un homme âgé de 45 ans dont le diagnostic montre une inflammation aigue des testicules (orchépididymite) il a subi une thyroïdectomie totale parce qu'il souffrait d'un goitre multinodulaire. ; Le patient 12 âgé de 41 ans présente des problèmes d'HTA il est aussi fumeur pour plus de 15 ans ; le patient 5 âgé de 33 ans souffre d'une cardiopathie son mode de vie est toxique vu la consommation d'alcool cela peut avoir un effet défavorable sur la qualité du sperme.

Le cinquième sous-groupe renferme le reste des échantillons (13, 11, 9, 6, 4, 15, 2, 7, 10, 1).

La valeur moyenne des distances d'agrégations est de 1 (**figure 23**), dans cet intervalle, le dendrogramme révèle un degré élevé de similitude de la composition en protéines séminales de presque tous les échantillons.

Cliniquement, les patients recrutés appartiennent à la tranche d'âge (30 - 50 ans), avec des pathologies associées (HTA pour les patients 1, 4, 7, 12 ; maladie respiratoire pour les patients 1, 6, 7 ; diabète pour de les patients 3, 6, 15 ; les maladies thyroïdiennes pour les patients 14, 15 ; cardiovasculaire pour les patients 4, 5) et les patients 13, 11, 9, 2, 10 sont sans pathologie associée.

Nous devons signaler un cas particulier, celui des patients 2 et 15, qui présentent des profils entièrement similaires malgré la différence d'âge 32 et 50 ans respectivement ; et aussi au niveau des pathologies associées vu que le patient 15 présente un diabète et une hypothyroïdie ; il a des antécédents de varicocèle en et prend des médicaments antidépresseurs. Tandis que le patient 2 est sans pathologie associée.

Les résultats des analyses en cluster de la composition en protéines séminales et l'état physiologique et pathologique des patients ne sont pas corrélés, autrement dit certains patients

Résultats et discussion

appartiennent au même groupe malgré les différences qui subsistent entre les patients recrutés entre eux d'une part et les différences qui existent entre les patients et le témoin d'autre part.

C'est-à-dire la classification des patients en fonction des profils protéiques n'a pas suivi l'état pathologique et physiologique des patients.

6. Indice de similarité des diagrammes protéiques des échantillons

L'indice de similarité ou indice de ressemblance (IRS) a été calculé, en rapportant l'indice de similarité absolu (IAS) au nombre total (N) des bandes présentes dans l'un, au moins, des diagrammes des échantillons comparés. L'IAS présente l'ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes les unes des autres c'est-à-dire les bandes qui ont la même mobilité.

Il calculé est ainsi : $IRS = IAS / N \times 100$

Les indices de similarité des protéines séminales dénaturées et réduites sont rassemblés dans un tableau. Des valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances et inversement, lorsque les diagrammes apparaissent très voisins. La plupart des échantillons restent différenciables car leurs diagrammes présentent au moins une différence significative.

Les indices de similarité ont été calculés pour 15 échantillons (14 ayant une infertilité masculine azoospermie et un sujet sain). Ils sont représentés sous forme d'une matrice dans le tableau 14. Cette matrice fournit les valeurs d'IRS trouvées entre les diagrammes protéiques comparés deux à deux. Il en ressort que l'indice de similarité se situe entre 50 % et 100 %.

Résultats et discussion

Tableau 14: Indices de similarité des protéines séminales dénaturées et réduites révélées par SDS-PAGE.

1	2	3	4	5	6	7	8T	9	10	11	12	13	14	15	
100%	70%	53,85%	77,78%	60%	66,67%	80%	66,67%	80%	90%	81,82%	66,67%	70%	80%	70%	1
	100%	72,73%	87,5%	66,67%	75%	88,89%	72,73%	88,89%	80%	72,73%	72,73%	78%	70%	100%	2
		100%	63,64%	63,64%	54,55%	66,67%	69,23%	66,67%	61,54%	57,14%	69,23%	72,73%	53,85%	72,73%	3
			100%	75%	85,71%	77,78%	63,64%	77,78%	70%	63,64%	63,64%	87,50%	77,78%	87,50%	4
				100%	62,50%	60%	63,64%	60%	54,55%	50%	50%	66,67%	60%	66,67%	5
					100%	66,67%	54,55%	66,67%	60%	54,55%	54,55%	75%	66,67%	75%	6
						100%	81,82%	80%	90%	81,82%	66,67%	70%	63,64%	88,89%	7
							100%	66,67%	75%	83,33%	57,14%	58,33%	53,85%	72,73%	8 T
								100%	90%	81,82%	81,82%	70%	80%	88,89%	9
									100%	90,91%	75%	63,64%	72,73%	80%	10
										100%	69,23%	58,33%	66,67%	72,73%	11
											100%	72,73%	81,82%	72,73%	12
												100%	70%	77,78%	13
													100%	70%	14
														100%	15

D'après le tableau ci-dessus, nous constatons d'abord des valeurs d'IRS moyennes de 50% observées entre certains patients, comme les patients 5 et 11, 5 et 12.

Des valeurs plus élevées, qui fluctuent entre 60% et 90% sont aussi présentes. A titre d'exemple ;

- IRS à 60 % entre les patients : 1 et 5, 5 et 7, 5 et 9, 6 et 10.
- IRS à 72.73 % entre les patients : 2 et 3, 2 et le témoin, 2 et 11, 2 et 12, 3 et 13, 3 et 15, le témoin et 15, 10 et 14, 11 et 15, 12 et 13, 12 et 15.
- IRS à 83.33 % entre les patients : le témoin et 11.
- IRS à 90 % entre les patients : 1 et 10, 7 et 10, 9 et 10.

Les diagrammes de ces différents patients présentent une légère dissemblance, ce qui implique une forte similarité dans la composition protéique.

Enfin, une valeur maximale d'IRS égale à 100 % est observée entre les patients 2 et 15. Ce qui signifie que ces patients présentent des diagrammes identiques avec la même composition protéique.

Conclusion et perspectives

Ce travail a été effectué pour explorer le protéome séminal des patients atteints d'azoospermie et le comparer avec celui du sujet sain par application des techniques d'électrophorèse monodimensionnelles SDS-PAGE, pour la recherche de protéines spécifiques pouvant avoir la propriété de biomarqueur pour le diagnostic de la maladie.

Une étude rétrospective est réalisée dans le service de procréation médicalement assistée (PMA) de la clinique Ibn Rochd, Constantine, cette étude inclut 14 patients atteints d'azoospermie dans l'année 2020. Les résultats de notre étude, ont montré :

- Une fréquence plus élevée de cette pathologie dans la tranche d'âge [40-44] ans ;
- Une prédominance d'infertilité primaire (78.57%) ;
- Une fréquence d'infertilité primaire chez la tranche d'âge de 40-44 ans avec un pourcentage de 35,71%, tandis que ceux de l'infertilité secondaire sont de 45-50 ans avec 14,28 % ;
- Concernant les antécédents pathologiques, une prédominance des antécédents médicaux par rapport aux autres antécédents ;
- Un effet modéré de l'activité professionnelle sur l'infertilité dont l'exposition à la chaleur et aux toxines semble être un facteur délétère pour la spermatogenèse ;
- Il y a un lien entre le statut tabagique (nombre de cigarette) et l'infertilité ;
- Cependant la relation entre l'IMC et l'infertilité a apporté un intérêt.

La méthode d'électrophorèse utilisée pour la séparation des protéines est celle de Laemeli (1970) modifiée par Singh (1991). Le choix de cette méthode était dans le but d'avoir une meilleure expression des protéines. Pour cela, la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été réalisée dans les conditions dénaturantes et réductrices.

Cette méthode nous a fourni des diagrammes satisfaisants et nous a permis de :

- Comparer les profils électrophorétiques des sujets malades avec celui du témoin et de remarquer que chacun des échantillons possède un profil protéique qui lui est propre et qui peut rassembler ou pas à celui d'un autre échantillon ou celui du témoin par l'absence ou la présence d'une ou plusieurs protéines,
- Révéler les mobilités de chacune des bandes protéiques,
- Identifier des bandes protéiques communes entre les échantillons qui présentent diverses pathologies.
- Distinguer les différences dans la composition protéique des patients malades et du témoin,
- Et enfin identifier quelques protéines susceptibles d'être des biomarqueurs séminaux de la maladie.

Conclusion et perspectives

En outre, une étude statistique a été réalisée en calculant les fréquences, l'indice de similarité, et également en établissant une classification hiérarchique des patients en se basant sur leurs diagrammes types a permis d'apprécier numériquement la diversité des protéines séminales dans les conditions dénaturantes et réductrices, mais cette analyse statistique n'était pas corrélée avec l'état physiopathologique des patients.

L'analyse électrophorétique des protéines séminales renferme 15 bandes protéiques de mobilités différentes. Une nette différence est observée entre le profil de témoin et des patients atteints d'azoospermie. Pour les protéines séminales, 6 bandes protéiques (B2, B5 et B4, B8 et B6, B12) communes entre les différents échantillons, sont les plus variables qualitativement et quantitativement et sont soit absentes ou présentes d'intensité égale ou différente par rapport à celles obtenues sur les profils de témoin et/ou des malades.

La comparaison des profils électrophorétiques a montré deux exemples de protéines séminales exprimées chez le témoin et relativement absentes chez les patients atteints d'une azoospermie ; les bandes B6 et B12 de masses moléculaires approximatives de 120 KDa et 40 KDa respectivement. Un autre exemple de protéine exprimée chez le témoin et les patients malades, la bande B8 de masse moléculaire approximative de 79 KDa. Cette protéine montre des variations d'expression quantitatives avec une intensité égale ou différente par rapport à celles du témoin.

L'application des techniques d'électrophorèse monodimensionnelle nous a fourni des résultats satisfaisants mais elle reste insuffisante pour le diagnostic et la surveillance de l'azoospermie.

En perspectives, nous envisageons à améliorer l'étude sur les protéines séminales par des études sur un nombre plus importants d'hommes infertiles atteints d'azoospermie et par l'utilisation de la technique d'électrophorèse bidimensionnelle afin d'identifier et d'accroître encore nos possibilités de trouver un ou plusieurs protéines susceptibles d'être considérées comme des biomarqueurs de cette pathologie et de l'identifier en second lieu par spectrométrie de masse.

Références bibliographiques

Auger (J), Jouannet (P). 2002. Manuel de laboratoire de l'OMS. Analyse du sperme humain et des interactions spermatozoïdes avec le mucus cervical. Edition INSERM.

Barnit. C, Orlando C, Caldini A.L, Casano R, Natali A, Chelo E. J, Bonfanti L, Forti T, Serio M. 1987. Immuno assayable somatomedin C in seminal plasma of azoospermic men. Int. J. Androl,10 : 457-462.

Besson D.2013. Étude du protéome de tumeurs colorectales [en ligne], Thèse de doctoraten Biologie Cellulaire. France : École Doctorale Biologie Santé Nantes-Angers,4-30. Format PDF disponible sur : <<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00951752>>.

Blanc B et Porcu G. 2002. Stérilité. Collection stratégie diagnostique et thérapeutique en gynécologie. Editions : Arnette. 19 p-462p.

Bourgeron T. Barbaux S. Mc Elreavey K. Fellous M. 1996. La génétique de la stérilité masculine. Soc. Franc de Génét. 12(11) :1-8.

Christian Kaham Penlap. 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.

Coat C, Perrin A, Talagas M, Tetefort R, Amice J, Valéri A, De Braekeleer M, Amice V, 2011 Azoospermie : prise en charge et résultats. À propos de 90 cas. Progrès en Urol. 21 : 946-954.

Cocuzza .M, Alvarenga .C, Pagani. R. 2013. The epidemiology and etiology of azoospermia. CLINICS ; 68 : 15-26.

Coulibaly A, Oumar. 2001. Caractéristiques cytospermiologiques de la stérilité masculine à propos de 598 examens. Thèse Méd. Bamako N°107.

Cummings J, Ward TH, Dive C. 2010. Fit-for-purpose biomarker method validation in anticancer drug development. Drug Discov Today; 15(19-20): 816-25.

Cummings J, Ward TH, Greystoke A et al. 2008. Biomarker method validation in anticancer drug development. Br J Pharmacol.; 153(4): 646-56.

Références bibliographiques

Daroui Mokaddem H., 2001- Exploration cytologique et biochimique dans l'hypo infertilité masculine. Thèse de magistère. F.S.N.V. U. Annaba, Algérie. P 80.

D'Cruz OJ, Haas G.G. 1989. Immunoreactive human epidermal growth factor in human seminal plasma. Clin. Endocrinol. Metab., 68 : 1136-1140.

Drabovich AP, Dimitromanolakis A, Saraon P, Soosaipillai A, Batruch I, et al. 2013. Diagnostic différentiel de l'azoospermie avec des biomarqueurs protéomiques ECM1 et TEX101 quantifiés dans le plasma séminal. Sci Transl Med ; 5 : 212ra160.

Drissi J, Drissi M, Koutaini A, Rhrab B, Fehati D, El Hamzaoui S. 2015. Les facteurs influençant l'infertilité masculine, 15-26.

Duvilla. E, Aknin-Seifer. I, Trombert-Paviot. B, Gentil-Perret. A, Tostain. J, Menezo.Y, Levy. R. 2006. Intérêt du dosage de l'inhibine B et de l'AMH dans le plasma séminal : étude préliminaire. Andrologie, 16(2), 143.

Fenichelp, Rey, Poggiolis, Danseaum, Chevallier.Pointis (G). 1999. Anti-Mullerian hormone as a marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia Human reprod., 14, 2020-2024.

Fransça LR, Avelar GF, Almeida FF. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. The riogenol.; 63:300-318.

Fraser GA, Meyer RM.2007. Biomarkers and the design of clinical trials in cancer. Biomarker Med. 1(3):387-97.

Geidam A. D, Yawe K. D. T, Adebayo A. E. A, Idrisa A. 2008 Hormonal profile of men investigated for infertility at the University of Maiduguri in northern Nigeria. Singapore Med J; 49: 538.

Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carré-Pigeon F, Wasels R, Benzacken B. 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.

Références bibliographiques

Gnoth C. 2005. Definition and Prevalence of Subfertility and Infertility. *Human Reproduction*,20 (5) :1144-1147.

Govin,J, Lestrat C, Caron C, Pivot-Pajot C , Rousseaux S, Khochbin S. 2006. Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis. *Ernst Schering Res Found Workshop*: 155-172.

Grazia Petrelli, And Mantovanib A. 2002. Environmental risk factors and male infertility and reproduction. *contraception*. Volume 65 ; issue 4 ; April ; pages 297 -300.

Hamamah S, Barthelemy C. 1997. Spermogramme et tests de fécondance. Intérêt et limites. *JTA*. 1-11.

Hamdi R, Juin 2013 - Stérilité et procréation médicalement assistée : le taux de réussite, en Algérie, est proche de celui mondial. *Santé-MAG* ;19.

Holmes S.D, Lipshultz L.I, Smith R.B. 1982. Transferrin and gonadal dysfunction in man. *Fertil. Steril.*, 38 : 600-604.

Houssein, M el hajjami. 2017. Infertilité Masculine : Profil Épidémiologique Et clinique. Thèse de doctorat en médecine.

Humeau C, Arnal F. 2005. Reproduction et développement. Editions sauramps médical. 61-80.

Huyghe E, Izard V, Rigot JM, Pariente JL, Tostain J. 2007. Evaluation de l'homme infertile : recommandations AFU. *Prog Urol*;18; 95-101.

Jared M Bieniek, Andrei P Drabovich, Kirk C Lo.2016. Biomarqueurs séminaux pour l'infertilité masculine. *Journal asiatique d'Andrologie* (2016) 18, 426–433 ; publié en ligne : 11 mars 2016.

Jensen Jr, Morbeck De. 2011. Fertility preservation. *Mayo Clin Proc*; 86:45–9.

Laemmli, U.K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685.

Références bibliographiques

Langman J. 1984. Développement normal et pathologique. Edition Masson. Embryologie médicale.

Lansac, J, Guérif F. 2005. AMP : l'assistance médicale à la procréation en pratique. Elsevier Masson.

Larsen WJ, Dhem A. 2007. Embryologie humaine. Paris- Maloine. :322-356.

Lue YH et al. 2002. Mild testicular hyperthermia induces profound transitional spermatogenic suppression through increased germ cell apoptosis in adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Androl*;23(6):799–805.

Mac Gregor I.R, Hargreave T.B, Elton R.A. 1987. Seminal plasma plasminogen activator and fertility *Andrologia*, 4: 452-455.

Manuel T. 2010. D'anatomie et de physiologie humaines 2eme édition, Gerard J Tortora, Bryan Derrickson.

Marcelli F, Robin G, Rigot J. M, 2009- Prise en charge de l'infertilité masculine. *Prog. Urol* ;19: 260-264.

Marrer E.2007. Promises of biomarkers in drug development – A reality check. *Chem Biol Drug Des* ;69 : 381-94.

Martin D, Campana A. 1997. Etiologie de 350 cas de stérilité masculine. Effet de divers traitements sur la qualité du sperme. ; 7 (2) :199-211.

McShane LM, Hunsberger S, Adjei AA .2009. Effective incorporation of biomarkers into phase II trials. *Clin Cancer Res.*; 15(6): 1898-905.

Nazzal N. 2002. Approche biologique et thérapeutique d'infertilité masculine. Thèse de doctorat en médecine. Université d'Annaba, Algérie.

Olivennes. F, Hazout. A, Frydman.R. 2006. Assistance médicale à la procréation 3e édition MASSON.

Références bibliographiques

OMS. 2003-2004. Présentation de l'infertilité. Serono :1-2.

Orlando C, Caldini A.L, Barni T, Wood W.G, Strasburger C.J, Natali A, Mayer A, Forti G, and Serio M. 1986. Ceruloplasmin and transferrin in human seminal plasma are they an index in seminiferous tubular function? *Fertil. Steril.*, 43:290-294.

Orlando C, Casano R, Caldini A.L, Forti T, Barni T, Bonfanti L, Serio M. 1988. Measurement of seminal LDH X and transferrin in normal and infertile men. *J. Androl.*, 9: 220-223.

Orlando C, Casano R, Forti Y, Barni T, Vanelli G.B, Baldoni G.C, Serio M. 1988. Immunologically reactive albumin like protein in human testis and seminal plasma. *J. Reprod. Fertil*, 13: 687-692.

Ounis L. 2014. Les anomalies morphologiques responsables des infertilités masculines dans l'Est Algérien.

Pienkowski .C, Cartault. A, Caula-legriél. S, Ajaltouni. Z, Daubin .M, Tauber.M. 2011. Syndrome de Klinefelter et syndrome de Turner : pour une meilleure prise en charge. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*, 39 : 521-524.

Plymate S.R, Fariss B.L, Smith M.L, Jacob W.H, Matej L.A. 1981. Seminal fluid androgen binding protein. *Andrologia*, 13:308-313.

Ravel .C Chantot-Bastaraud. S, Cretet. J, Roynard. P, Sibony .M, Maurin. N, Belaud-Rotureau M-A, Berthaut.I. 2011. Syndrome de Klinefelter : qualité des gamètes et spermatogénèse. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*, 39 : 525-528.

Rodriguez Martinez. 2011. *American Journal of Reproductive Immunology*; 11–22.

Romanetto J. 2011. Intérêts des marqueurs biologiques dans les essais cliniques (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré). Format PDF disponible sur : <<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01739098>>.

Rouvière H, Delmas A. 1992. Anatomie humaine, descriptive topographique et fonctionnelle. In, Masson. Vol. 564-96.

Références bibliographiques

Rouvière H. 1992. Anatomie humaine tome II. Tronc 11ième édition Paris Masson 1074 : 609 – 610.

Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AM. 2000. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge university Press.

Sapin.E. 2014. Ectopie testiculaire, cryptorchidie : de quoi parle-t-on ? Indications opératoires. Archives de pédiatrie, 21 : 113-117.

Saula, Alexandre. 2017. Infertilité masculine et obésité : étude rétrospective sur une cohorte de patients du Centre Médico-Chirurgical Obstétrique des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Thèse de doctorat. Université de Lorraine.

Scaros O, Fisler R. 2005. Biomarker technology roundup: from discovery to clinical applications, a broadset of tools is required to translate from the lab to the clinic. Biotechniques.Suppl:30-2.

Schlosser J, Nakib F, Carré-Pigeo M, Staerman F. 2006. EMC Infertilité masculine : définition et physiopathologie. Urologie.

Schlosser J, Nakib I, Carré-pigeon F, Staerman F. 2007. Infertilité masculine : définition et physiopathologie. Annales d’Urologie ;41 :127-133.

Schlosser J, Nakib I, Carré-Pigeon F, Stearman F. 2007. Infertilité masculine : stratégie de prise en charge. EMC Urologie 12 : 18-760.

Seifer I, Fellous M, Bignon Y.J. 1999. Causes génétiques de l’infertilité masculine. Annaes. Biol. Clin. 57(3) :301-308.

Sharpe, Richard M, Stephen Franks, 2002 Environment, Lifestyle and Infertility-an Inter-Generational Issue. Nat. Cell. Biol. 4 Suppl: s33-40.

Singh, N.K. Shepherd K.W et Cornish G.B 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. Journal of Cereal Science, 14 :203-208.

Références bibliographiques

Soufir J.C.1983. L'exploration biochimique humain. Rev. Prat : 57, 3141-3147.

Staerman F, Hermabessiere J. 1993. Guide pratique de l'infertilité masculine. Progrès en Urologie, monographie.

Terriou P, Barry, Caparos-Langlois D. 2000. Anatomie de l'appareil génital masculin. Anatomie du corps humain. ; 9-15.

Thonneau P., Marchand S., Tallec A., Ferial M. L., Ducot B., Lansac J., 1991- Incidence and main cause of infertility in a resident population (1850000) of three French regions (1988-1989). In, 811-6:6.

Wai Yee W, Gerhard A. 2003. Zielhuisb new evidence of the influence of exogenous and endogenous factors on sperm count in man. European journal of obstetrics and gynecology and reproductive biology. 10 September. volume 110; issue 1; page 49-54.

Zorn J.-R, M. 2005. SAVALE Stérilité du couple 2 e édition MASSON.

Annexes

Annexe 1

Questionnaire

Nom du patient : Prénom : Tél :

Age du patient : Age de son partenaire :

Poids du patient Kg Taille cm

-Profession :

-Avez-vous souffert d'une infertilité primaire ou secondaire ?

-Infertilité primaire

-Infertilité secondaire

➤ S'il s'agit d'une infertilité secondaire :

-Vous essayez d'avoir un bébé depuis combien de temps ?

-Quelques semaines

-Plusieurs mois

- Plusieurs années

La question	Oui	Non
S'il s'agit d'une infertilité primaire :		
-Votre femme souffre aussi d'une infertilité ?		
-Avez-vous d'autres antécédents urogénitaux ?		
Si oui lesquelles ?.....		
-Avez-vous des antécédents familiaux ?		
Si oui précisez ?.....		
- Etes-vous sous traitement hormonal ?		
Si oui : -Quoi :		
-Quand :		
-Avez-vous eu une de ces maladies ?		
-Maladie cardiovasculaire ?		
-Diabète ?		
Si oui de quel type s'agit-il ? 1 <input type="checkbox"/> : 2 <input type="checkbox"/>		
-Maladie de la glande thyroïde ?		
-Maladie respiratoire ?		
- Quel type de traitement suivez-vous ?		
-antidépresseive		
-Bains chaudes		
-Pratiquez-vous du sport ?		
-Si oui : Quels sports avez-vous ou pratiquez-vous ? -.....		
-Etes-vous fumeur ?		
Si oui :		
-Combien de cigarettes fumez-vous par jour ? -.....		
-Vous êtes fumeur depuis combien de temps ? -.....		
-ancien fumeur		
-Etes-vous alcoolique ?		
-Stress		

Annexe 2

Gel de séparation (runing gel) :

- Acrylamide 40% 12,4ml
- Bis acrylamide 2% 2,4ml
- Eau distillée 8,6ml
- Tampon Tris-HCL pH 8,8 15,2ml
- SDS 10% 0,40ml
- APS 1% 1ml
- TEMED 0,020ml

Gel de concentration (stacking gel) :

- Acrylamide 40% 1ml
- Bis acrylamide 2% 0,3ml
- Eau permutée 10,2ml
- Tampon Tris-HCL pH 6, 8 1,7ml
- SDS 10% 0,14ml
- APS 1% 0,70ml
- TEMED 0,014ml

Annexe 3 : tableau qui résume les dosages de la gamme étalon

Concentration solution étalon BSA (mg/ml)	DO
0,01	0,087
0,02	0,125
0,04	0,193
0,06	0,22
0,08	0,28
0,1	0,294

Annexe 4 : : tableau des dosages des échantillons

N° de tube d'échantillons	DO	Concentration
1	1,489	0,61
3	1,466	0,6
4	1,511	0,61
5	1,469	0,6
6	1,391	0,56
7	1,495	0,61
8 T	1,473	0,6
9	1,387	0,56
12	1,436	0,58
13	1,42	0,58
15	1,345	0,54

Résumé

Au cours de ces dernières années, les troubles de l'infertilité ne cessent d'augmenter. Un couple sur dix (15 %) consulte au cours de sa vie pour un problème d'infertilité et dans 20% des cas, l'infertilité est d'origine masculine et dans 40% des cas, elle est mixte. On retrouve de nombreuses étiologies : anatomiques, génétiques et environnementales. Néanmoins, près de 10 % des cas d'infertilité sont inexpliqués.

Un biomarqueur est une molécule biologique trouvée dans les tissus ou les fluides biologiques utilisée comme un outil biologique permettant de distinguer un état médical normal d'un état pathologique et notamment dans de diagnostic précoce.

L'objectif de cette étude est d'investiguer et explorer le protéome du liquide séminal des patients atteints d'azoospermie par l'utilisation de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes réductrices pour la recherche des biomarqueurs du liquide séminal. Cette observation de protéines qui montrent des différences qualitatives ou bien quantitatives nous donne une idée directe sur l'expression ou bien la répression de certains gènes qui pourraient être associés à cette pathologie. Pour cela 14 patients ayant une azoospermie âgée de 30 ans jusqu'à 50 ans ont été recrutés pour un prélèvement du fluide séminal. Nous avons comparé les profils électrophorétiques des protéines du liquide séminal du sujet sain et des malades.

L'analyse des gels a permis de dénombrer 15 bandes protéiques de mobilités différentes. Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines séminales, une étude statistique a été effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité, également en établissant des diagrammes types et une classification hiérarchique des individus selon la composition des protéines du liquide séminal.

Ces résultats préliminaires ont montré des protéines du fluide séminal spécifiques et/ou variantes au cours de l'azoospermie susceptibles d'être considérées comme des marqueurs de la pathologie étudiée, ce qui ouvre des champs d'investigation nouveaux tant dans le domaine du diagnostic que dans le suivi de ces pathologies.

Toutefois, aucun de ces marqueurs ne peut être proposé pour une utilisation routinière en Pratique clinique à ce jour mais des études complémentaires sur le protéome séminal sont nécessaires pour valider ces nouveaux biomarqueurs.

Mots clés : azoospermie, liquide séminal, biomarqueur, électrophorèse, diagnostic.

Abstract

In recent years, infertility disorders have continued to increase. One in ten couples (15%) consult during their lifetime for an infertility problem and in 20% of cases the infertility is of male origin and in 40% of cases it is mixed. We find many etiologies: anatomical, genetic and environmental. However, almost 10 % of infertility cases are unexplained.

A biomarker is a biological molecule found in tissues or biological fluids used as a biological tool to distinguish a normal medical condition from a pathological condition and in particular in early diagnosis.

The objective of this study is to investigate and explore the proteome of the seminal fluid of patients with azoospermia by the use of the one-dimensional SDS-PAGE electrophoresis technique under reducing denaturing conditions for the search for biomarkers of seminal fluid. This observation of proteins that show qualitative or quantitative differences gives us a direct idea of the expression or repression of certain genes that could be associated with this pathology. For this, 14 patients with azoospermia aged 30 to 50 years were recruited for a seminal fluid sample. We compared the electrophoretic profiles of seminal fluid proteins in healthy subjects and in patients.

Analysis of the gels identified 15 protein bands of different mobilities. In order to numerically appreciate the diversity of these seminal proteins, a statistical study was carried out by calculating the frequencies, the similarity index, also by establishing standard diagrams and a hierarchical classification of individuals according to the composition of the proteins of the seminal fluid.

These preliminary results showed specific seminal fluid proteins and / or variants during azoospermia likely to be considered as markers of the pathologies studied, opening up new fields of investigation both in the field of diagnosis and in the monitoring of these pathologies.

However, none of these markers can be proposed for routine use in clinical practice to date, but further studies on the seminal proteome are needed to validate these new biomarkers.

Keywords: azoospermia, seminal fluid, biomarker, electrophoresis, diagnosis.

ملخص

في السنوات الأخيرة ، استمرت اضطرابات العقم في الزيادة. يستشير واحد من كل عشرة أزواج (15 ٪) خلال حياتهم مشكلة العقم ، في 20 ٪ من الحالات يكون العقم من أصل ذكر وفي 40 ٪ من الحالات يكون مختلطاً، نجد العديد من الأسباب : التشريحية والجينية والبيئية. ومع ذلك ، ما يقرب من 10٪ حالات العقم غير مبررة .

المؤشر الحيوي هو جزيء بيولوجي موجود في الأنسجة أو السوائل البيولوجية يستخدم كأداة بيولوجية لتمييز حالة طبية طبيعية عن حالة مرضية وبشكل خاص في التشخيص المبكر .

الهدف من هذه الدراسة هو دراسة و استكشاف بروتينوم السائل المنوي للمرضى الذين يعانون من نقص الحيوانات المنوية في السائل المنوي من خلال استخدام تقنية الهجرة الكهربائية ذات بعد واحد في ظروف الحد و تغيير الطبيعة للبحث عن المؤشرات الحيوية للسائل المنوي. تعطينا هذه الملاحظة للبروتينات التي تظهر اختلافات نوعية أو كمية فكرة مباشرة عن التعبير أو قمع جينات معينة يمكن أن ترتبط بهذا المرض. لهذا ، تم تجنيد 14 مريضاً يعانون من نقص النطاف الذين تتراوح أعمارهم بين 30 و 50 عاماً لأخذ عينة السائل المنوي. لقد قارنا أسلوب الهجرة الكهربائية لبروتينات السائل المنوي بين الشخص السليم و المرضى.

إن تحليل الهلام مكننا من عد 15 شريط بروتين ذات حركات مختلفة من أجل التقدير الرقمي لتنوع بروتينات السائل المنوي. ثم إجراء دراسة إحصائية عن طريق حساب الترددات، مؤشر التشابه و أيضاً من خلال إنشاء مخططات بيانية قياسية و تصنيف هرمي للأفراد وفق تركيبة بروتينات السائل المنوي .

أظهرت هذه النتائج الأولية بروتينات محددة وأو متغيرة من السائل المنوي من المحتمل أن يتم اعتبارها كعلامات للأمراض المدروسة ، هذا يفتح ميادين جديدة من الدراسة في مجال متابعة و مراقبة اضطرابات العقم.

ومع ذلك ، لا يمكن اقتراح أي من هذه المؤشرات الحيوية للاستخدام الروتيني في الممارسة السريرية حتى الآن ، ولكن هناك حاجة إلى دراسات إضافية على البروتين المنوي للتحقق من هذه المؤشرات الحيوية الجديدة.

الكلمات المفتاحية: نقص الحيوانات المنوية ، السائل المنوي ، المؤشر الحيوي ، الهجرة الكهربائية ، متابعة .

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en biochimie
Option : Biochimie appliquée

Thème : Etude épidémiologique et exploration du protéome séminal des patients atteint d'une azoospermie par l'utilisation de techniques d'électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE.

Résumé

Au cours de ces dernières années, les troubles de l'infertilité ne cessent d'augmenter. Un couple sur dix (15 %) consulte au cours de sa vie pour un problème d'infertilité et dans 20% des cas, l'infertilité est d'origine masculine et dans 40% des cas, elle est mixte. On retrouve de nombreuses étiologies : anatomiques, génétiques et environnementales. Néanmoins, près de 10 % des cas d'infertilité sont inexplicables.

Un biomarqueur est une molécule biologique trouvée dans les tissus ou les fluides biologiques utilisée comme un outil biologique permettant de distinguer un état médical normal d'un état pathologique et notamment dans de diagnostic précoce.

L'objectif de cette étude est d'investiguer et explorer le protéome du liquide séminal des patients atteints d'azoospermie par l'utilisation de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes réductrices pour la recherche des biomarqueurs du liquide séminal. Cette observation de protéines qui montrent des différences qualitatives ou bien quantitatives nous donne une idée directe sur l'expression ou bien la répression de certains gènes qui pourraient être associés à cette pathologie. Pour cela 14 patients ayant une azoospermie âgée de 30 ans jusqu'à 50 ans ont été recrutés pour un prélèvement du fluide séminal. Nous avons comparé les profils électrophorétiques des protéines du liquide séminal du sujet sain et des malades.

L'analyse des gels a permis de dénombrer 15 bandes protéiques de mobilités différentes. Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines séminales, une étude statistique a été effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité, également en établissant des diagrammes types et une classification hiérarchique des individus selon la composition des protéines du liquide séminal.

Ces résultats préliminaires ont montré des protéines du fluide séminal spécifiques et/ou variantes au cours de l'azoospermie susceptibles d'être considérées comme des marqueurs de la pathologie étudiée, ce qui ouvre des champs d'investigation nouveaux tant dans le domaine du diagnostic que dans le suivi de ces pathologies.

Toutefois, aucun de ces marqueurs ne peut être proposé pour une utilisation routinière en Pratique clinique à ce jour mais des études complémentaires sur le protéome séminal sont nécessaires pour valider ces nouveaux biomarqueurs.

Laboratoire de Génétique biochimie et Biotechnologies Végétales, Département de Biochimie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie Université frères Mentouri Constantine 1.

Mots clés : azoospermie, liquide séminal, biomarqueur, électrophorèse, diagnostic.