

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم : بيولوجيا الحيوان

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

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Génétique**

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

Covid 19, infertilité masculine et polymorphisme de l'ECA

Présenté par : Daoud Wahida
Kebaili Kaouther
Khaled Anis

Le 20/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadrant : CHELLAT Djalila Pr. Université des frères Mentouri Constantine 1
Examineur 1 : SATTA Dalila Pr. Université des frères Mentouri Constantine 1
Examineur 2 : REZGOUN M^{ed} Larbi MCA. Université des frères Mentouri Constantine 1

**Année universitaire
2021 – 2022**

Table des matières

Remerciements et dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	

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

Etude bibliographique

Chapitre 1 : Physiologie de la reproduction

1. Système reproducteur masculin	3
1.1. Organes sexuels masculins.....	3
1.1.1. Organes génitaux externes.....	3
1.1.2. Organes génitaux internes	4
2. Différenciation sexuelle.....	4
3. Spermatogenèse	5

Chapitre 2 : Infertilité masculine

1. Epidémiologie	6
2. Classification de l'infertilité masculine	7
2.1. Infertilité primaire et secondaire	7
2.2. Localisation de l'anomalie	7
2.3. Anomalies du sperme	8
2.4. Obstructives ou non obstructives	8
3. Causes de l'infertilité masculine	8
3.1. Causes pré-testiculaires : dysfonctionnement sexuel	8
3.2. Causes endocriniennes	8
3.3. Causes testiculaires	8
3.4. Causes idiopathiques	9

Chapitre 3 : Génétique de l'infertilité masculine

1. Anomalies chromosomiques	10
1.1. Anomalies du nombre	10
1.1.1. Syndrome de Klinefelter (47, XXY)	10
1.1.2. Syndrome du mâle (XX)	10
1.2. Anomalies de structure	11
1.3. Anomalies plus rares	11
2. Micro délétions du chromosome Y	11
2.1 Gènes candidats de la région AZF	11
3. Gènes liés au chromosome X et infertilité masculine	12
4. Mutations génétiques	12

Chapitre 4 : ECA et infertilité masculine

1. Système rénine angiotensine	15
2. Enzyme de conversion de l'angiotensine	16
2.1. Structure de l'ECA	16
2.2 Fonctions de l'ECA	16
3. Gène ECA	16
3.1 Structure du gène ECA	16
3.2 Polymorphismes du gène ECA	17
3.3 Polymorphisme de l'ECA et infertilité masculine	17

Chapitre 5 : COVID 19 et infertilité masculine

1. Epidémiologie	18
2. Mode de transmission	18
3. Variantes du SARS COV 2	19
3.1 Lignée B.1.1.7 (Variante Alpha)	20
3.2 Lignée B.1.351 (Variante Beta)	20
3.3 Variant P.1 (Variante Gamma)	20
3.4 Lignée B.1.617.2 (Variante Delta)	21
3.5 Variante CAL.20C	21
3.6 Variante Omicron	21
4. Symptômes	22
5. ECA, infections à Covid-19 et infertilité masculine	22
6. Impact du SARS-COV 2 sur l'ECA 2 sue le système reproductif masculin.	23
6.1 Rôle des médiateurs COVID-19 sur la FIV et d'autres ART	25

Etude pratique

1. Patients et méthodes	26
1.1 Type d'étude.....	26
1.2 Recrutement des patients infertiles	26
1.2.1 Critères d'inclusion	26
1.2.2 Critères d'exclusion	26
1.3 Recrutement des témoins	26
2. Méthodes	26
2.1. Questionnaire	26
2.2. Prélèvement sanguin	26
3. Étude moléculaire	27
3.1 Extraction de l'ADN (Technique au NaCl)	27
3.1.1 Principe	27
3.1.2 Préparation des leucocytes	27
3.1.3 Extraction de l'ADN	27
3.1.4 Solubilisation de l'ADN	28
3.2 PCR	28
3.2.1 Première étape : dénaturation thermique	28
3.2.2 Deuxième étape : hybridation des amorces ou « annealing »	28
3.2.3 Troisième étape : élongation et extension d'amorce	28
3.2.4 Préparation du milieu réactionnel de la PCR	29
3.2.5 Contrôle des produits de la PCR	30
3.2.6 Migration électro phorétique et révélation de la PCR	30
4. Analyse statistique	31
4.1 Odds ratio (OR)	32
4.2 Intervalle de confiance	32

Résultats et discussion

1. Caractéristiques des patients	33
1.1 Répartition de la population d'étude selon l'âge	33
1.2 Répartition de la population d'étude selon la consommation du tabac	34
1.3 Répartition de la population d'étude selon le type du Covid-19	35
2. Résultats de l'étude moléculaire	36
2.1 Répartition des fréquences génotypique et alléliques du polymorphisme ID du gène <i>ECA</i>	37
Conclusion et perspectives	39
Références bibliographiques	40
Annexes	
Résumés	

Remerciements

Nous remercions avant tout le Bon Dieu qui nous a donné le courage et la volonté de réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier infiniment, en premier lieu, notre encadreur, professeur **REZGOUN-CHELLAT Djalila**, pour ses précieux conseils, pour sa bonne humeur, sa disponibilité, sa confiance, son aide, ses remarques avisées, ses encouragements qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port et nous avons énormément appris avec elle, autant sur le plan scientifique que personnel.

Nous remercions très sincèrement, professeur **SATTA Dalila** qui, en tant que responsable de la formation Génétique Moléculaire, s'est toujours montré à l'écoute de tous les étudiants, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer malgré ses charges académiques et professionnelles et aussi d'avoir accepté de présider notre jury de soutenance et d'examiner notre travail.

Nos sincères remerciements à monsieur **REZGOUN Mohamed Larbi**, maître de conférence A à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, d'avoir accepté d'expertiser notre travail et pour l'honneur qui nous a fait de siéger au jury de notre soutenance.

Nos sincères remerciements à tous les enseignants de génétique moléculaire d'avoir partagé avec nous leurs passions pour l'enseignement et la recherche

Enfin, un grand merci à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce mémoire de Master.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de plusieurs années d'étude à :

La femme la plus chère du monde, ma très chère mère « **MOUNIRA** », la source de tendresse qui a tout donné sans rien recevoir, je ne pourrais exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour toi, tes sacrifices innombrables et ton dévouement fait pour moi un encouragement. Tu es la lumière de mes jours, la femme de mon cœur, ma vie, maman.

Je t'adore.

Ce travail est dédié à mon père « **HOUCINE** ». Je suis fière d'être votre fille et ce travail est le fruit des sacrifices que tu as consentis pour mes études et ma formation. Sans toi ce jour n'aurais pas existé. Merci beaucoup Je t'aime cher papa.

En signe de l'affection et du grand amour que je vous porte, mes chères sœurs « **CHOUBEILA** » et « **SAOUSSEN** » et pour aussi mon petit frère « **SALAH EDDINE** » les mots sont insuffisants pour exprimer ma profonde estime. Et aussi « **MANOU** » merci mon bonheur et mon amour. Je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection et de mon attachement indéfectible.

A mes meilleures amies « **NIHED** » et « **RACHA** » pour vos conseils et aides, je dédie ce travail aussi à **DELAL, SABI, DOUSSA, SARAH, ...** merci pour vos soutiens moraux.

Je dédie aussi ce travail pour tous les membres de ma deuxième famille Association Ness El Khir Constantine **TAREK. DJAMIL, RAMY, JJI, ...**

A toute la famille **KEBAILI & AMIER.**

A mes trinômes **ANIS & OUAHIDA.**

En souvenir des moments heureux passés ensemble, vous êtes pour moi des frères et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Enfin, à tous ceux qui m'aiment et m'avaient soutenu.....

Kouki

Je dédie ce mémoire :

A ma très chère mère : Zendaoui Yassmina

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A mon très cher père : Zendaoui Hassen

Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es. Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

A ma sœur : Malak, la puce de notre famille, et la mienne par la même occasion.

Ma grande Sœur. Je sais enfin ce que sais le bonheur d'avoir une grande sœur sur laquelle on peut compter, moi qui n'en ai jamais eu. Je te dis merci et je te souhaite bonheur, réussite et prospérité.

A toute ma famille

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

A mes amies Samia, Anissa , Manat ... Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous a unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Daoud Wahida

Dédicaces

Je veux dédier cet humble travail de fin d'études à :

À ma maman et mon papa **Warda** et **Djamel**. Pour leur amour, leurs sacrifices, leurs précieux conseils, et surtout leur soutien et leur confiance dans chaque pas que je fais et chaque décision que je prends. Aucun mot ne peut vraiment exprimer à quel point je suis reconnaissant envers vous deux, ni ne peut vous remercier suffisamment. j'essaie chaque jour de vous rendre tous les deux fiers de moi et j'espère que j'y arriverai un jour.

À mon frère et ma sœur **Yasser** et **Lina** je vous aime tous les deux

À tous ceux qui m'ont souhaité bonne chance dans mon parcours : ma grand-mère, mon cousin **Souhil**, mes oncles et tantes des deux familles **Khaled** et **Belaifa**

À mes amis proches **Mustafa**, **Yasser**, **Abdou**, **Nadoush**

À mes chers collègues **Kouki** et **Khadouj**

Et tous ceux qui m'ont eu dans leurs prières merci à vous tous

Et enfin à moi-même, je mérite un peu de reconnaissance

Love you All

Thank You

ANIS

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
ADN	Acide Désoxy Ribonucléique
ANG	Antigenosine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ART	technologie de la reproduction assistée
AT1R	Récepteur de l'angiotensine II de type 1
AURKC	Aurora kinase C
AZF	Facteur d'azoospermie
BPY2	Protéine de base sur le chromosome Y 2
CDY1	CDY1a et CDY1b; chromo Domain protein, Y chromosome 1
DAZ	Deleted in azoospermia
DDX3Y	Hélicase à boîte morte 3 liée à l'Y
ECA	Antigène commun entérobactérien
EIF1AY	Facteur d'initiation eucaryote 1A
ES	Séquençage de l'exome
FIV	Fécondation in vitro
FSH	Hormone de stimulation folliculaire
GnRH	Gonadotropin - Releasing hormone
hACE2	Human Angiotensin-converting enzyme 2
ICMART	International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies
ICSI	Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes
KB	Kilo bases
LH	Hormone lutéinisante
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
MMAF	Anomalies morphologiques multiples des flagelles
MMP2	Matrix metalloproteinase-2
NGS	Séquençage de nouvelle génération
OAT	Oligoasthéo-tératozoospermie idiopathique
OMS	Organisation mondiale de la sante
PCR	Polymerase chain reaction
RAAS	Système rénine-angiotensine-aldostérone
RBD	Domaine de liaison des récepteurs
SAFEX	Société algérienne de fertilité et de contraception
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SK	Syndrome de klinefelter
SMCY	Selected Mouse cDNA on Y
SRA	Surface-Related Antigen
SRAS-	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

CoV-2	
SRS	Syndrome d'inversion sexuelle masculine
SRY	Région déterminant le sexe
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale alpha
USP9Y	Ubiquitin-specific Protease 9, Y chromosome
VOC	Variantes préoccupantes
VOI	Variantes d'intérêt
WES	Séquençage de l'exome entier
WGS	Séquençage du génome entier

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Etudes rapportant une infertilité masculine ou féminine au niveau mondial	7
II	Connaissance actuelle des causes monogéniques récurrentes impliquées dans l'infertilité masculine	14
III	Quantités de chaque constituant du milieu réactionnel de la PCR du gène ECA.	29
IV	Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de la région 3' non codante du gène ECA.	30
V	Conditions de PCR pour le gène ECA.	30
VI	Tableau de contingence	32
VII	Répartition des patients selon la tranche d'âge.	33
VIII	Comparaisons des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme ID du gène ECA chez les patients et les témoins	37

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Schéma du système reproducteur masculin et ses principales composantes	3
2	Schéma descriptif des différentes étapes de la spermatogenèse, et leur durée respective chez l'homme	5
3	Représentation schématique du chromosome Y montrant les trois régions AZF : AZFa, AZFb, AZFc et les gènes localisés dans chacune d'elles	12
4	Système rénine-angiotensine-aldostérone. Le système rénine-angiotensine aldostérone est une cascade de régulation endocrinienne et enzymatique servant à préserver l'homéostasie hydro sodé	15
5	Structure de la protéine ECA	16
6	Localisation et structure du gène de l'ECA	17
7	Représentation schématique de la location du polymorphisme ID du gène <i>ECA</i>	17
8	Les modes de transmissions des virus respiratoires	19
9	Les causes possibles de l'infertilité dans COVID-19	24
10	Électrophorèse sur gel d'agarose, montrant le schéma d'amplification du polymorphisme du gène <i>ECA</i> (I/D)	31
11	Répartition des patients selon la consommation de tabac	34
12	Répartition de la population d'étude selon les types du Covid-19	35
13	Profil d'électrophorèse de la PCR du Polymorphisme ID du gène <i>ECA</i> .	36

Introduction

Ne pas avoir d'enfants a été le plus grand problème dans la vie d'un couple marié, et l'on pensait que les femmes étaient la raison de l'échec de la conception, mais au fur et à mesure que la science se développe et que la société s'ouvre à l'idée de trouver un remède au problème, il est devenu clair que l'infertilité des hommes est également responsable dans 20 à 30% des cas (Agrawal *et al.*, 2015).

L'infertilité masculine, telle que définie par l'organisation mondiale de la santé, est l'incapacité à obtenir une grossesse après 12 mois ou plus de rapports sexuels réguliers et non protégés" (Abroulaye, 2021).

La spermatogenèse est un processus dynamique et multiétape de prolifération et de différenciation des cellules germinales mâles par lequel les spermatozoïdes sont produits à partir de cellules germinales primordiales. Les causes des défauts spermatogéniques chez les hommes infertiles sont multifactorielles et de nombreux facteurs environnementaux, nutritionnels, comportementaux et génétiques affectent l'infertilité masculine. Dans la plupart des cas d'infertilité, les mécanismes sous-jacents restent obscurs. La génomique et la protéomique offrent de nouveaux outils pour mieux comprendre la génétique de l'infertilité masculine (Singh *et al.*, 2011).

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est une dipeptidyl carboxy-peptidase liée à la membrane qui génère l'angiotensine II vasoconstrictrice et inactive la bradykinine vasodilatatrice. Le gène *ECA* code pour deux isozymes : l'isozyme somatique (sECA) est présente dans de nombreux tissus, y compris les cellules endothéliales vasculaires, tandis que l'isozyme spécifique du testicule (tECA) est exprimée exclusivement dans les spermatides en développement et les spermatozoïdes matures (Liao *et al.*, 2002). L'importance de l'ECA dans la reproduction masculine a été récemment démontrée par des études d'élimination de l'ECA où des souris mâles dépourvues de l'ECA présentent une fertilité réduite en raison d'un défaut de migration des spermatozoïdes dans les oviductes et une capacité réduite des spermatozoïdes à se lier à la zone pellucide (Liao *et al.*, 2002).

Le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-COV-2), un virus à ARN monocaténaire, s'est avéré être l'agent causal de la maladie dite à coronavirus. Depuis l'épidémie, bien que non concluantes, des découvertes ont été faites concernant la compréhension de l'épidémiologie, de l'étiologie, des caractéristiques cliniques, du traitement clinique et de la prévention de la maladie. Le SARS-COV-2 a été détecté dans la salive, les fluides respiratoires, le sang, l'urine et les fèces. Les résultats sont toutefois controversés en ce

qui concerne sa présence dans le sperme ou les testicules (Omolaoye *et al.*, 2021). En ce qui concerne la présence et l'impact du SARS-COV sur la reproduction masculine, les résultats restent controversés.

Plusieurs études ont démontré une forte association entre l'insertion/délétion (I/D) de l'ECA1 et la COVID-19. Les porteurs d'ECA1-DD ont des taux sanguins d'ECA plus élevés, environ deux fois supérieurs à ceux des individus ECA1-II, et ont été associés à l'hypertension, au syndrome de détresse respiratoire aigue (SDRA) et à la mortalité hospitalière. Par conséquent, l'allèle de délétion est associé à la progression du COVID-19 ainsi qu'au taux d'infection et à la mortalité liés au SRAS-CoV-2, tandis que le génotype ECA1-II présente une corrélation négative avec le taux d'infection et la mortalité (Hatami *et al.*, 2020).

Le but de notre travail de recherche est de :

- effectuer une étude bibliographique traitant d'une part l'infertilité masculine : ses causes et sa relation avec le polymorphisme du gène de l'ECA et d'autre part la COVID 19 : ses symptômes, ses causes et ses modes de transmission ainsi que sa relation avec le polymorphisme de l'ECA et l'infertilité masculine.
- réaliser une étude moléculaire cas-témoin investiguant l'association possible entre le polymorphisme I/D du gène ECA et l'infertilité masculine pour des patients infertiles idiopathiques qui ont été contaminés par la COVID 19.

Bibliographie

Chapitre 1

Physiologie de la reproduction

1. Système reproducteur masculin

Le système reproducteur masculin est un système complexe, qui comporte de chaque côté :

- les gonades (les testicules coiffés par l'épididyme et logés dans le scrotum).
- un système de canaux (les canaux efférents, les épидидymes, les canaux déférents, l'ampoule urétrale, les conduits éjaculateurs et l'urètre).
- les glandes accessoires (les vésicules séminales, la prostate et les glandes de Cowper) (Barthelemy, 2006) (Figure 1).

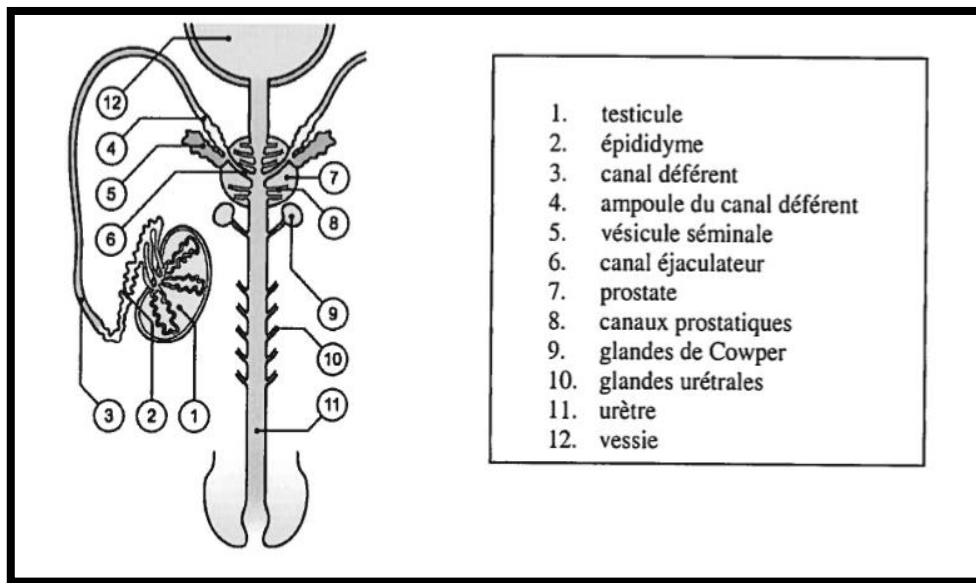


Figure 1 : Schéma du système reproducteur masculin et ses principales composantes (Barthelemy, 2006).

1.1. Organes sexuels masculins

Les organes reproducteurs masculins sont classés en deux catégories :

1.1.1. Organes génitaux externes

Testicule : il est situé dans la bourse. De forme ovale, les testicules mesurent environ 4 cm de long et 2,5 cm de large chez l'adulte. Chaque glande est entourée d'une membrane issue du péritoine abdominal et dont les prolongements divisent le testicule en 250 à 300 lobules contenant chacun 3 ou 4 tubules séminifères. Les tubules séminifères rejoignent alors un réseau de conduits, appelé réticulum testiculaire. Les testicules sécrètent des androgènes, en particulier la testostérone qui favorise le développement des organes reproducteurs et des caractères sexuels secondaires), et ils produisent des spermatozoïdes.

Épididyme : c'est un tube situé derrière le testicule. Il reçoit le sperme qui le dirige vers le canal déférent. L'épididyme mesure environ 6 mètres : il faut trois semaines aux spermatozoïdes pour le parcourir et y terminer leur maturation.

Canal déférent : c'est un mince conduit d'environ 45 cm de long. La partie externe de l'abdomen est incluse dans le cordon spermatique (le pédicule contenant les artères, les veines séminales, les nerfs et les ligaments qui relient le testicule et l'abdomen). Le canal déférent pénètre dans l'abdomen par l'ouverture inguinale du canal éjaculateur à l'entrée de la prostate. Il y transporte le sperme.

Pénis : quant au pénis, il mesure en moyenne 10 à 12 cm de diamètre au repos et 15 à 16 cm en érection. Il se compose de l'urètre, d'un corps spongieux entourant l'urètre et de deux organes érectiles, les corps caverneux, qui sont flasques de l'intérieur.

1.1.2. Organes génitaux internes

Vésicules séminales : sont deux sacs derrière la prostate et la vessie, de 5 à 7 cm de long ; ils fabriquent du plasma séminal visqueux et alcalin, qui avec les sécrétions de la prostate formeront les spermatozoïdes.

Canaux éjaculateurs : qui suivent les vésicules séminales, expulsent le sperme dans l'urètre lors de l'éjaculation.

Prostate : est une glande qui pèse 15 à 20 grammes chez l'adulte, se situe sous le col de la vessie et entoure l'urètre. Il sécrète du plasma séminal, qui se lie aux sécrétions des vésicules séminales et des spermatozoïdes, et active la motilité des spermatozoïdes.

Glandes de Cooper : situées sous la prostate, produisent une sécrétion épaisse qui nettoie l'urètre juste avant l'éjaculation (Gautier, 2017).

2. Différenciation sexuelle

La différenciation sexuelle de l'homme est fortement influencée par les hormones peptidiques et les stéroïdes qui dirigent collectivement le développement des organes. Les cellules qui accomplissent cette fonction sont les cellules de Leydig, qui vont produire de la testostérone après avoir été induites par les cellules de Sertoli. La testostérone va conduire à la formation et au développement des canaux déférents, de l'épididyme, des vésicules séminales et du canal éjaculateur. La dihydrotestostérone va provoquer la

masculinisation des organes génitaux pour former un pénis et un scrotum, et la production de l'hormone anti-mullerienne (AMH) qui va empêcher ce système de se développer en organes génitaux féminins (Ahmed *et al.*, 2002).

3. Spermatogénèse

La spermatogénèse a lieu dans les tubules séminifères (Holstein *et al.*, 2003). Elle commence à partir de cellules souches (spermatogonies) qui se reproduisent par simple mitose (division mitotique), les spermatogonies sont ensuite transformées en spermatocyte 1 qui subiront une réduction méiotique pour produire des spermatocytes 2 qui subiront la méiose II qui donnera naissance à des spermatides (Figure 2). Les spermatozoïdes qui sont en fait des spermatozoïdes immatures passeront par une étape de maturation appelée spermiogénèse. La dernière étape permet au sperme d'obtenir les outils nécessaires à la fécondation. La spermatogénèse commence à la puberté et est permanente. Le processus de formation des cellules germinales peut être divisé en 14 étapes distinctes. Toutes les cellules germinales ne sont pas complètement matures, beaucoup sont dégénérées et englouties par les cellules de Sertoli (Barthelemy, 2006).

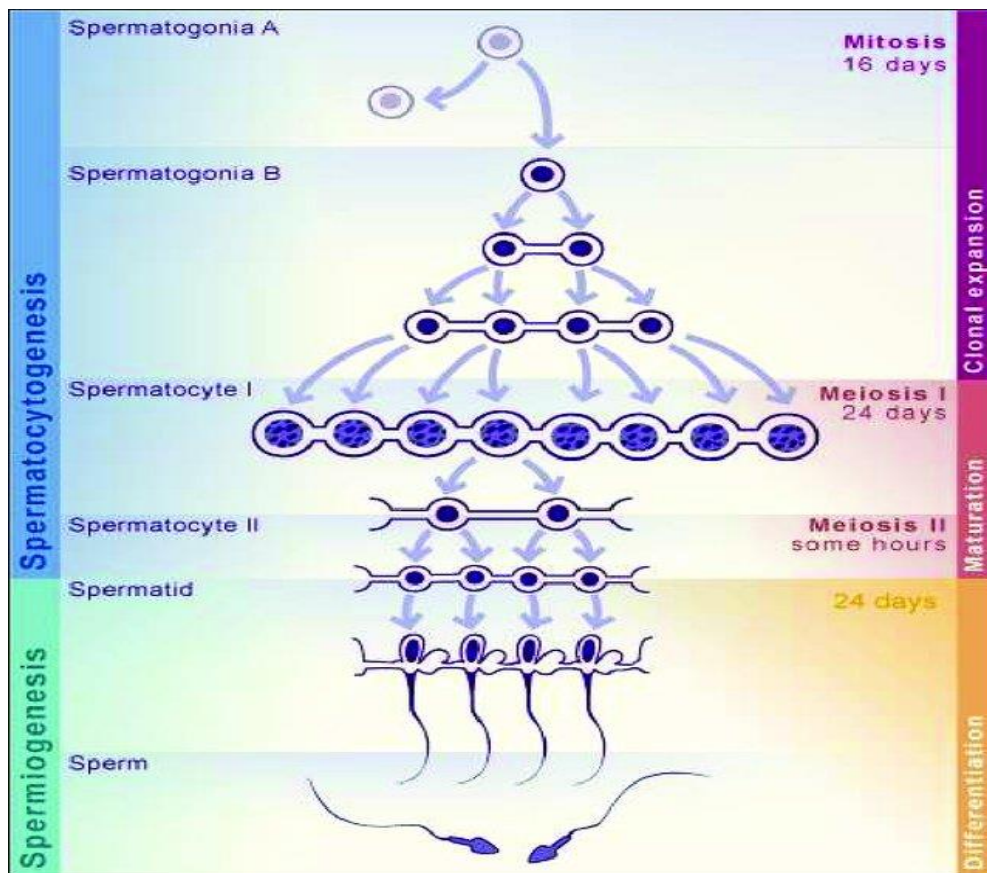


Figure 2 : Schéma descriptif des différentes étapes de la spermatogénèse, et leur durée respective chez l'homme (<http://www.embryology.ch>).

Chapitre 2

Infertilité masculine

L'infertilité est considérée comme une "maladie" selon l'International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) (Arafa *et al.*, 2020). C'est l'absence totale de conception après 12 mois de relations sexuelles régulières non protégées (Abroulaye, 2021). Et cette période peut être raccourcie à 6 mois si le partenaire est âgé (Frikh *et al.*, 2021). Environ 7 % de la population masculine est touchée, ce qui explique collectivement l'infertilité de la moitié des couples touchés (Manon *et al.*, 2019). L'infertilité masculine est définie comme l'incapacité d'un homme à rendre enceinte une femme fertile (Leslie *et al.*, 2021).

1. Epidémiologie

De nombreuses raisons ont un effet négatif sur les efforts des chercheurs pour mesurer statistiquement la prévalence de l'infertilité masculine parce qu'elle est moins documentée dans les pays moins développés ou en voie de développement, et cela est dû à des peurs culturelles, des tabous ou même simplement au coût élevé du traitement dans certains endroits ou dans certains cas (Leslie *et al.*, 2021).

La cause de l'infertilité est exclusivement masculine dans 20 à 30 % des cas et une cause masculine y contribue dans 20 % des cas, mais cela ne peut pas être représentatif du monde entier en raison d'un manque de statistiques précises dans les différentes parties du monde (Agrawal *et al.*, 2015).

La réduction du nombre de spermatozoïdes signalée dans le monde entier est très préoccupante. Alors que le nombre moyen de spermatozoïdes était de 113 millions/ml en 1940, il est tombé à 66 millions/ml dans les années 90 (Leslie *et al.*, 2021). Des études récentes ont également montré que les hommes infertiles ont un risque plus élevé de développer un cancer par rapport à la population générale, nous pouvons remarquer que les hommes azoospermiques ont le risque le plus élevé car il a été rapporté que 5 à 8 % des patients atteints de cancer du testicule ont une azoospermie.

Il a été rapporté que les taux d'infertilité étaient les plus élevés en Europe centrale et orientale (8 à 12 %), en Australie (8 à 9 %) et en Amérique du Nord (4,5 à 6 %). L'Afrique subsaharienne est censée avoir les taux les plus élevés d'infertilité masculine, mais le manque de rapports montre que les taux sont faibles (Agrawal *et al.*, 2015).

Les statistiques manquent lorsqu'il s'agit du nombre d'hommes stériles en Algérie. La plupart du temps, c'est la femme qui est responsable de l'incapacité à avoir un enfant, mais selon Bouzekrini, président de la société algérienne de fertilité et de contraception (Safec),

le taux d'infertilité masculine en Algérie se situe environ à 15% (Le Midi Libre, 2012). Et selon Bendhaou, président de Merck pour l'Afrique du Nord et de l'Ouest, 40% des cas sont dus à l'infertilité masculine (Le quotidien d'Oran, 2016).

Tableau I : Etudes rapportant une infertilité masculine ou féminine au niveau mondial (Agrwal *et al.*, 2015).

	hommes déclarés infertiles	Couples déclarés infertiles	Couples dans lesquels le facteur masculin est l'un des multiples facteurs impliqués
Amérique du nord	4,5-6%	15%	50%
Moyen-Orient	Inconnu	Inconnu	60%-70%
Afrique sub-saharienne	2,5%-4,8%	12,5%-16%	20-40%
Europe	7,5%	15%	50% de tous les couples infertiles
Australie	8%-9%	15%	40%
Europe centrale et orientale	8%-12%	20%	56%
L'Asie	Inconnu	Inconnu	37%
Amérique latine	Inconnu	Inconnu	52%
L'Afrique	Inconnu	Inconnu	43%

2. Classification de l'infertilité masculine

L'infertilité masculine peut être classée en fonction de différentes variables telles que la localisation de l'anomalie, les malformations du sperme, l'infertilité primaire ou secondaire et les anomalies obstructives ou non obstructives (Lawrence et Chandrasekar, 2014).

2.1 Infertilité primaire et secondaire

Les types d'infertilité les plus courants est l'infertilité primaire, alors que l'infertilité secondaire concerne les hommes qui ont déjà conçu un enfant sans aide reproductive mais qui ne peuvent plus le faire (Kazemijalish et al., 2015 ; Lawrence et Chandrasekar, 2014).

2.2 Localisation de l'anomalie

Les localisations de l'anomalie à l'origine de l'infertilité masculine sont divisées en:

- **pré-testiculaire** : dysfonctionnement érectile, troubles éjaculatoires tels que l'éjaculation précoce, l'éjaculation rétrograde.
- **testiculaire** : échec testiculaire
- **post-testiculaire** : toutes les lésions obstructives/sub obstructives du tractus séminal (Lawrence et Chandrasekar, 2014).

2.3 Anomalies du sperme

Les anomalies du sperme peuvent être : azoospermie, oligozoospermie, asthénozoospermie, ou tératozoospermie, seule ou en combinaison (Lawrence et Chandrasekar, 2014).

2.4 Obstructives ou non obstructives

Cette classification est si utile lorsqu'il s'agit de sa valeur pronostique et de la possibilité de définir la prise en charge ultérieure du patient (Lawrence et Chandrasekar, 2014).

3. Causes de l'infertilité masculine

Différentes causes contribuent à l'infertilité masculine, que l'on peut classer en trois catégories : congénitale, acquise ou idiopathique (Agrawal *et al.*, 2021).

3.1 Causes pré-testiculaires : dysfonctionnement sexuel

Il existe deux types de troubles sexuels : la dysfonction érectile ou la dysfonction éjaculatoire.

La dysfonction érectile est un problème grave qui conduit à l'infertilité dans 2 cas, soit une érection absente, soit une érection insuffisante pour la pénétration, il peut être dû à des problèmes organiques (cardiovasculaires, etc.) ou relationnels (conflits au sein de la famille et/ou du couple) ou intrapsychiques (comme la dépression) (Lotti et Maggi, 2018).

La dysfonction éjaculatoire qui est le résultat d'une aspermie qui peut se produire pour deux raisons : l'anéjaculation qui est l'incapacité à transporter le sperme ou une éjaculation rétrograde qui est l'incapacité à éjaculer dans une direction antérograde (Lotti et Maggi, 2018).

3.2 Causes endocriniennes

La FSH et la LH agissent comme des intermédiaires dans le processus du maintien de la qualité et de la quantité des spermatozoïdes, toute maladie qui affecte la sécrétion de la GnRH ou plus spécifiquement la sécrétion de la FSH et de la LH altère la spermatogenèse (Anawalt, 2013).

3.3 Causes testiculaires

La cause la plus fréquente d'infertilité masculine et la plus dangereuse, qui comprend les mutations génétiques, le cancer des testicules, l'irradiation pelvienne ou le syndrome de

Klinefelter. Le testicule peut être soumis à des lésions traumatiques et ischémiques qui peuvent altérer complètement sa fonction exocrine (Anawalt, 2013).

3.4 Causes idiopathiques

La forme la plus courante d'infertilité masculine est l'oligoasthéo-téatozoospermie idiopathique (OAT), due à une insuffisance testiculaire primaire qui se manifeste par des défauts quantitatifs de la spermatogenèse (Sudhakar *et al.*, 2021). Environ 30 à 50 % des cas d'infertilité masculine sont idiopathiques, sans cause discernable ou contribution à l'infertilité féminine. Elle implique une altération des caractéristiques du sperme (Agarwal *et al.*, 2021).

Chapitre 3

Génétique de l'infertilité masculine

La transmission éventuelle des anomalies génétiques responsables de l'infertilité masculine représente un vrai challenge pour qu'ils aient une descendance. Parmi elles, les anomalies chromosomiques sont les plus fréquentes et le caryotype des patients atteints d'azoospermie ou d'oligozoospermie non obstructive doit être étudié.

L'infertilité masculine humaine a une composante génétique notable, y compris des diagnostics bien établis comme le syndrome de Klinefelter, les microdélétions du chromosome Y et les causes monogéniques. Les progrès réalisés dans le domaine du séquençage de nouvelle génération (NGS) ont grandement facilité la détection impartiale, à l'échelle de l'exome (séquençage de l'exome entier (WES)) et du génome entier (séquençage du génome entier (WGS)), de toute variante génétique susceptible de jouer un rôle dans l'infertilité masculine (Houston *et al.*, 2021).

1. Anomalies chromosomiques

Après la découverte de la première anomalie chromosomique humaine en 1959, la cytogénétique médicale est née. Les anomalies chromosomiques constitutionnelles sont des troubles génétiques fréquents en pathologie humaine pouvant entraîner des troubles de la reproduction, des malformations congénitales liées ou non à une déficience intellectuelle et / ou des troubles du comportement (Dimassi *et al.*, 2017).

1.1 Anomalies du nombre

1.1.1 Syndrome de Klinefelter (47, XXY)

Le syndrome de Klinefelter (SK) est une anomalie chromosomique masculine courante (47,XXY) qui fait l'objet d'attention et de recherches depuis sa première parution dans les années 1940. Cependant, le SK peut être identifié avant la naissance, la puberté, l'adolescence ou à l'âge adulte.

Le SK est à l'origine d'une non disjonction à la méiose ou bien de la mitose ce qui entraîne l'aneuploïdie. Il y a deux variations génétiques qui existent : dans 90% des cas, l'anomalie se présente sous une forme pure ou homogène avec un caryotype 47,XXY. Et dans les 10% restants l'anomalie se présente en mosaïque : 47, XXY/46, XY, ou en une aneuploïdie de grade supérieur : 48,XXY ; 49,XXXXY ou bien encore sous forme d'anomalies structurelles touchant le chromosome 2 (Bearely *et al.*, 2019).

1.1.2 Syndrome du mâle (XX)

Le syndrome d'inversion sexuelle masculine (SRS) 46, XX est une maladie rare avec un phénotype de dysplasie de genre (Yan *et al.*, 2021). Il a été décrit par La Chapelle et al en

1964, pour la première fois. Il peut être observé dans 1 cas sur 20 000-25 000 naissances. Il est caractérisé par un phénotype masculin avec un caryotype 46,XX. Les individus porteurs sont (SRY)+ dans 80 % et (SRY)- dans 20 % des cas en fonction de la présence de la région *SRY* sur le chromosome X. Les hommes SRY- 46,XX présentent souvent des anomalies génitales et une perte de masculinisation car ils sont presque toujours diagnostiqués dans la petite enfance. Les hommes SRY+ 46,XX ont souvent une puberté normale, alors que certains d'entre eux présentent une cryptorchidie (Mayouf *et al.*, 2021).

1.2 Anomalies de structure

Les anomalies de structure pouvant être équilibrées lorsqu'il n'y a pas de perte ou de gain ou bien déséquilibrées dans le cas contraire (Dimassi *et al.*, 2017).

1.3 Anomalies plus rares

Les anomalies plus rare est comme l'anomalie du fragilité chromosomique (Dimassi *et al.*, 2017).

2. Microdélétions du chromosome Y

Les facteurs génétiques sont responsables de 21 à 29% des azoospermies. Cependant, dans environ 50% des cas, la cause est encore inconnue, la condition est appelée « infertilité idiopathique ». Il est à noter aussi que les micros délétions Yq sont connues pour être associées à l'infertilité masculine.

La présence du facteur d'azoospermie (AZF), un locus responsable de spermatogénèse. Ce dernier est divisé en 3 régions : AZFa, AZFb, AZFc (Figure 3) (Uzayetal., 2021).

Les caractéristiques héritées du chromosome Y humain fournissent des marqueurs de lignée sous la forme d'haplotypes uniques transmis directement de père en fils (Akcan et Boduroglu, 2021). Les délétions de l'une de ces régions peuvent être responsable du phénotype d'infertilité.

2.1 Gènes candidats de la région AZF

La région AZFa : la délétion AZFa supprime une région de 0,792 MO qui comprend deux gènes candidats à copie unique USP9Y (DFFRY) et DDX3Y (DBY) qui ont des conséquences phénotypiques dans les cellules germinales. Une délétion de la région AZFa a été observée chez 31 hommes infertiles (3,2%) (Rani *et al.*, 2019).

La région AZFb : la région AZFb contient les palindromes P2 à P5, et la partie proximale de P1. Les délétions AZFb sont causées par une recombinaison homologue entre les

palindromes P5/P1 proximaux qui suppriment un fragment de 6,2 Mb et de multiples copies des gènes CDY2, EIF1AY, PRY, RBMY1, SMCY, TTY5, TTY6 et provoquent une spermatogenèse anormale. Les délétions AZFb représentent 3,5% (Rani *et al.*, 2019).

La région AZFc : précédemment appelée région minimale AZF, de taille 3,5 Mb, et contient les gènes BPY2, CDY1, CSPG4LY, DAZ, GOLGA2LY, TTY3, TTY4, en nombre de copies variable provoquant un échec de la spermatogenèse et l'infertilité masculine. 6,9% des cas ont présenté une délétion complète de la région AZFc (b2/b4) (Rani *et al.*, 2019).

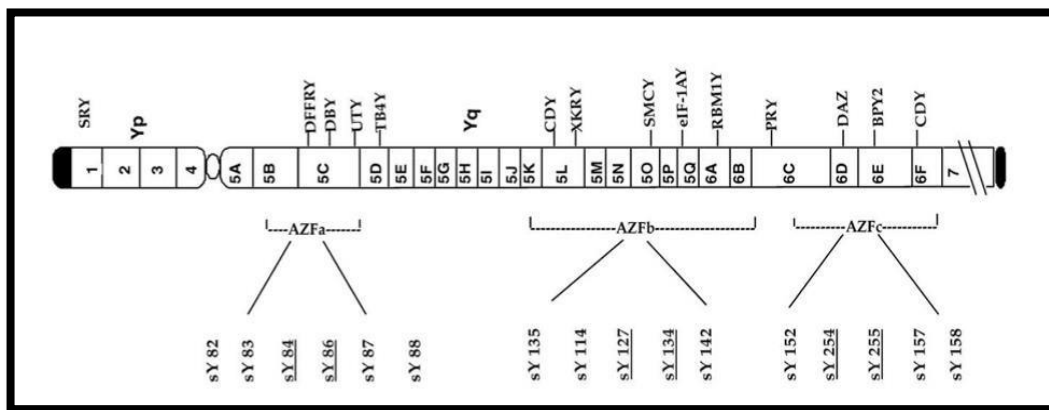


Figure 3 : Représentation schématique du chromosome Y montrant les trois régions AZF : AZFa, AZFb, AZFc et les gènes localisés dans chacune d'elles (Mcelreavey *et al.*, 2002).

3. Gènes liés au chromosome X et infertilité masculine

Les hommes héritent d'un seul chromosome X et sont hémizygotes pour les gènes liés au chromosome X. Des études génomiques antérieures ont montré que le chromosome X est enrichi en gènes de la spermatogenèse. Auparavant, des études génomiques avaient montré que le chromosome X était enrichi en gènes de la spermatogenèse. Divers gènes du chromosome X liés à la fertilité chez l'homme ont été identifiés récemment. *TEX11* est le premier gène de méiose lié à l'X, qui forme des foyers distincts sur les chromosomes méiotiques pendant la gamétogenèse mâle et femelle. Les souris mâles déficientes en *TEX11* présentent une réparation défectueuse des cassures double brin et un dérèglement du crossing over qui entraîne l'apoptose des spermatocytes au stade pachytène et donc l'infertilité (Sudhakar *et al.*, 2021).

4. Mutations génétiques

La première revue systématique de la validité clinique des causes monogéniques de l'infertilité masculine a été publiée en 2019, faisant état de 78 gènes liés à 92 phénotypes.

Ce nombre a rapidement augmenté, et en 2021, déjà 104 gènes ont été liés avec certitude à 120 phénotypes d'infertilité masculine et de développement génito-urinaire anormal (Laan *et al.*, 2021).

Environ la moitié des gènes d'infertilité masculine établis sont impliqués dans des défauts de développement rares des gonades, des glandes surrénales, de l'hypothalamus, de l'hypophyse ou des canaux déférents, et 20 % supplémentaires ou plus sont liés à la spermiogenèse et aux conditions ultrarares de défauts qualitatifs des spermatozoïdes affectant la motilité et la morphologie (Laan *et al.*, 2021).

Le séquençage de l'exome (ES), devenu disponible il y a dix ans, a ouvert la "chasse" aux causes monogéniques de divers autres sous-types d'infertilité masculine. Il a permis des percées dans la génétique des anomalies ultrarares de la morphologie (térazoospermie) et de la motilité (asthénozoospermie) des spermatozoïdes, qui se présentent généralement sans diminution importante du nombre de spermatozoïdes.

Certaines anomalies qualitatives des spermatozoïdes, telles que la globozoospermie et la macrozoospermie, sont dues à des variantes pathogènes dans un seul gène, *DPY19L2* et *AURKC*, respectivement (Tableau 2). En revanche, les anomalies morphologiques multiples des flagelles des spermatozoïdes (MMAF) sont causées par des défauts dans un ensemble diversifié de protéines localisées dans les flagelles des spermatozoïdes. Après un phénotypage clinique minutieux, le rendement diagnostique actuel de l'analyse génétique ciblée atteint déjà ~60%. Des variantes pathogènes dans certains gènes (par exemple *DNAH17*) ont été rapportées dans la globozoospermie ainsi que dans la MMAF, suggérant une possible étiologie commune. Ainsi, une attention particulière doit être accordée au conseil génétique et à la prise de décision clinique dans les cas de MMAF.

Tableau II : Connaissance actuelle des causes monogéniques récurrentes impliquées dans l'infertilité masculine (Laan *et al.*, 2021).

Parameter	Congenital developmental defects			Qualitative or quantitative defects in spermatogenesis				
	CBAVD	46 XY, DSD	CHH	MMAF	Macroz.	Globoz.	NOA	SO
Male prevalence	0.1%	Up to 0.02%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	~1%	~5%
Known genes (n)	2	~30 major (>60 reported)	~30 major (>60 reported)	~20	1	5	Up to ~50 ^f	Candidates
Examples of confident disease genes (LP/P variants in ClinVar, n) ^b	<i>CFTR</i> (770), <i>ADGRG2</i> (9)	<i>AR</i> (166), <i>SOX9</i> (62), <i>SRD5A2</i> (46), <i>WT1</i> (53), <i>NR5A1</i> (33), <i>HSD3B2</i> (32), <i>SRY</i> (28), <i>HSD17B3</i> (21), <i>POR</i> (19), <i>CYP11A1</i> (13); deletions (<i>WT1</i> , <i>DMRT</i> regions) and duplications (<i>DAX1</i> , <i>WNT4</i>)	<i>CHD7</i> (401), <i>FGFR1</i> (94), <i>ANOS1</i> (32), <i>GNRHR</i> (22), <i>FGF8</i> (16), <i>PROKR2</i> (8), <i>PROK2</i> (7), <i>TACR3</i> (10), <i>AMH</i> (6), <i>KISS1R</i> (5); deletions (<i>ANOS1</i>)	<i>DNAH1</i> (30), <i>CFAP43</i> (13), <i>CFAP44</i> (6), <i>DNAH2</i> (5), <i>TTC29</i> (5), <i>DNAH17</i> (4), <i>CFAP65</i> (4), <i>FSIP2</i> (4)	<i>AURKC</i> (6)	<i>DPY19L2</i> : hom. gene deletions (most cases), rare SNVs (5)	<i>TEX11</i> (2), <i>FANCM</i> (4), <i>TEX14</i> (3), <i>MSH4</i> (3), <i>STAG3</i> (9), <i>MEIOB</i> (3), <i>SYCE1</i> (3); <i>M1AP</i> (2), <i>KLHL10</i> (1); deletions (<i>DMRT1</i> , <i>TEX11</i> , <i>SYCE1</i>)	Reported LP/P variants in <i>ZMYND15</i> , <i>FANCM</i> , <i>MSH4</i> , <i>M1AP</i> , <i>LHB</i> , <i>TDRD9</i> , <i>RPL10L</i> , <i>NR5A1</i> , etc. Full <i>AZF</i> a, <i>AZF</i> b or <i>AZF</i> c deletions ^d <i>AZF</i> c r2/r3 inv + del (12 cases reported) ^e
Inheritance mode	aut. rec., XL	aut. dom., aut. rec., XL	aut. dom., aut. rec., XL, di- & oligogenic	aut. rec., XL	aut. rec.	aut. rec.	Mostly aut. rec. or XL, less known aut. dom., oligogenic	
Disturbed functions	Ductal obstruction	Gonadal & genital development; steroidogenic pathways	GnRH neuron development & migration	Structure & motility of the flagellum	Cell division	Acrosomal function	Failed or impaired spermatogenesis; possible qualitative sperm defects in SO	
Diagnostic yield	>80% (bi) >30% (uni)	Up to 50%	~50%	30–60%	n.a.	~60%	Mostly < 5% (See Table 2)	n.a.
Genetic testing approaches	Single gene sequencing	Targeted gene panel sequencing ES and <i>in silico</i> gene panel			Single gene sequencing	ES Deletion analysis	Combined approaches	
Added value in infertility	ART options	Early sex assignment; multidisciplinary	Hormone therapy; multidisciplinary	Optimal clinical solutions for the couple to achieve parenthood; personalised long- term treatment and management;				

Chapitre 4

ECA et infertilité masculine

1. Système rénine angiotensine

Le système rénine (RAAS) est un système important pour la survie afin de maintenir le tonus vasculaire en régulant le volume de liquide extracellulaire et la pression artérielle. Grâce à ce système, l'eau, le sang, le plasma, la lymphe et le liquide interstitiel sont étroitement contrôlés. La rénine et l'angiotensinogène sont les deux éléments de base qui composent ce système.

L'homéostasie physiologique de ce système est régulée par l'équilibre entre l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et l'ECA2. L'ECA convertit l'angiotensine I (Ang I) en angiotensine II (Ang II) qui, par son interaction avec le récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1R), induit une forte vasoconstriction et déclenche des voies pro inflammatoires, préapoptotiques et profibrotiques dans le poumon et d'autres organes. Dans le SRAA, l'ECA2 contribue à l'inactivation de l'Ang II, en l'hydrolysant en Ang-1-7, et, par conséquent, s'oppose physiologiquement aux effets de l'Ang II/AT1R, en même temps qu'il stimule la vasodilatation et favorise les actions anti-inflammatoires, antifibrotiques et antithrombotique (Figure 4) (Niguez *et al.*, 2021).

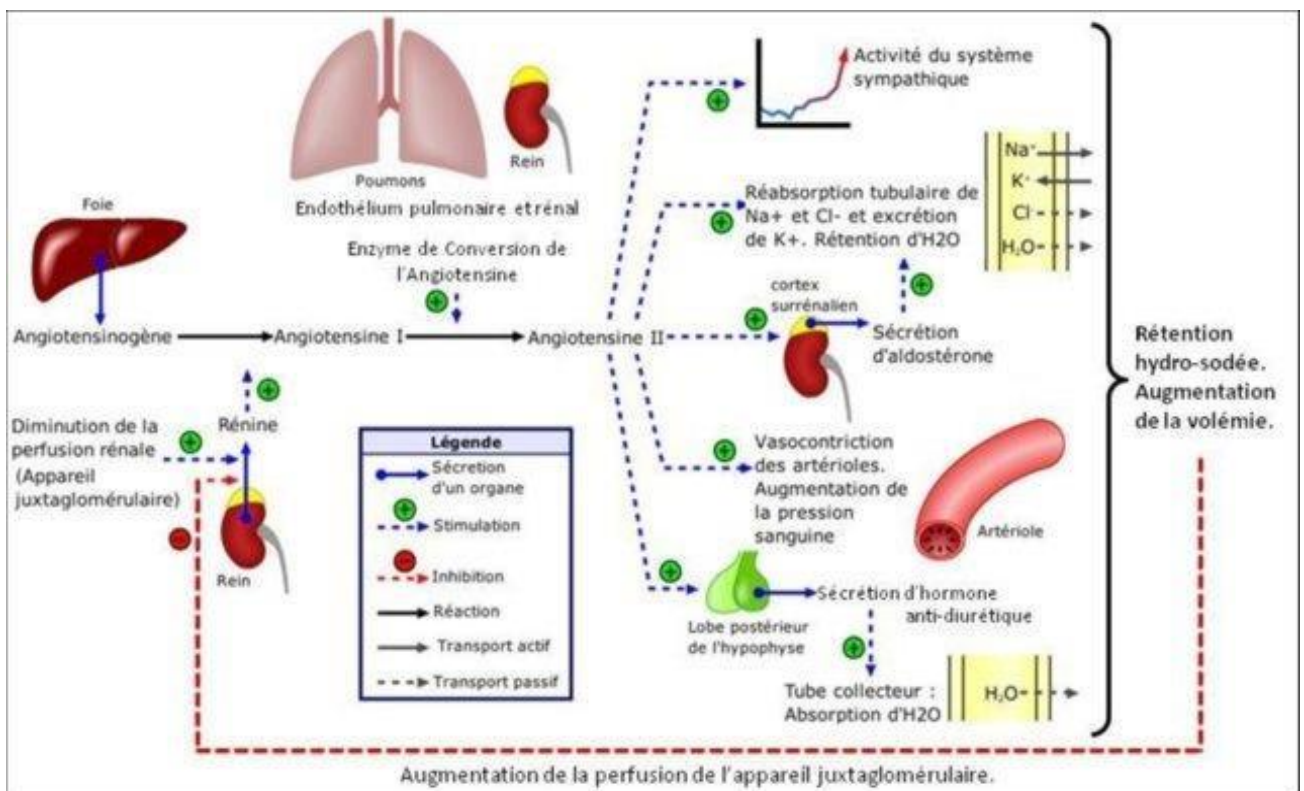


Figure 4: Système rénine-angiotensine-aldostérone. Le système rénine-angiotensinealdostérone est une cascade de régulation endocrinienne et enzymatique servant à préserver l'homéostasie hydrosodée (Calvier, 2012).

2. Enzyme de conversion de l'angiotensine

2.1 Structure de l'ECA

Chez les mammifères, deux isoformes de l'ECA existent, l'une est exprimée dans le tissu somatique (sECA, 1306 résidus) et l'autre dans les cellules germinales des testicules mâles (gECA, 732 résidus). La structure des deux formes diffère ; la forme gECA a un seul site actif, tandis que sECA a deux sites actifs (Figure 5).

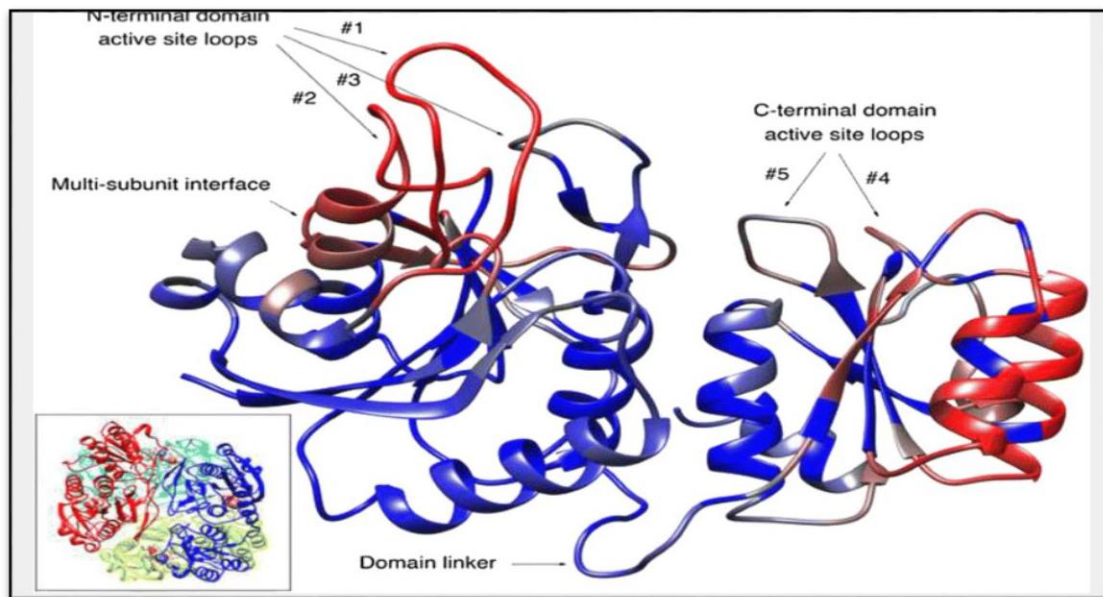


Figure 5 : Structure de la protéine ECA

2.2 Fonctions de l'ECA

Le système RAAS joue un rôle pivotant dans le liquide et l'homéostasie du sel. L'une des étapes biochimiques clés du RAAS est la conversion du décapeptide inactif de l'angiotensine I (AngI) en octapeptide actif de l'angiotensine II (AngII) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Il est important de noter que la génération d'AngII par l'ECA est inversée par son isoforme ECA2 (qui élimine l'AngII). Par conséquent, le niveau physiologique d'AngII est généralement déterminé par l'équilibre entre les activités ECA et ECA2 dans les tissus. Cet équilibre est important dans les maladies cardiovasculaires, ainsi que dans la COVID-19 (Patel *et al.*, 2017).

3. Gène *ECA*

3.1 Structure du gène *ECA*

Le gène de l'ECA humain est localisé sur le chromosome 17 en position 17q23, s'étend sur 21 Kb et contient 26 exons et 25 introns. Son transcription mature, possède une taille de 4,3 Ko, de la 1^{ère} à la 26^{ème} transcription. L'ARNm de l'isoenzyme germinale est transcrit

du 13 au 26^{ème} exons uniquement (Dhar *et al.*, 2012). Le gène possède deux promoteurs fonctionnels, le premier codant pour une forme somatique sECA et le second promoteur du gène code pour la forme germinale tECA. Le promoteur somatique de l'ECA est actif dans plusieurs cellules, tandis que les promoteurs germinaux ne sont activés que dans les cellules germinales mâles (Figure 6) (Nigel, 1996).

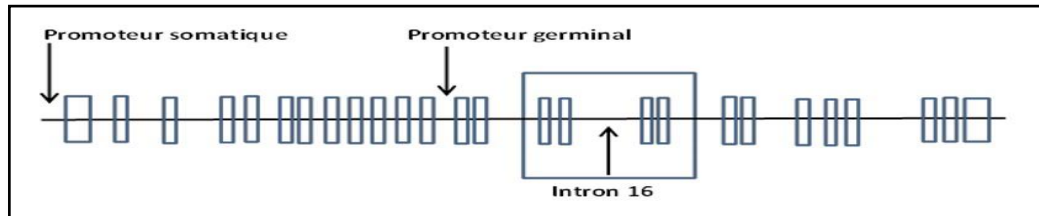


Figure 6 : Localisation et structure du gène de l'ECA (Mehri *et al.*, 2005).

3.2 Polymorphismes du gène ECA

Un total de 78 variantes moléculaires du gène ACE ont été identifiés (Rieder *et al.*, 1999). Parmi ces polymorphismes, le plus important est l'insertion ou la délétion d'une séquence de 287 Pb dans l'intron 16 de ce gène. Cet élément Alu est supposé inséré (plutôt que supprimer) parce que sa séquence a la plus grande similitude avec d'autres éléments Alu spécifique à l'homme (Batzer *et al.*, 1994 ; Dufour *et al.*, 2000).

Dans la séquence Alu de l'intron 16 du gène de l'ECA, il existe un polymorphisme fonctionnel, représenté par une insertion/délétion (I/D) de 287 pb (rs4646994). L'allèle D est significativement associé à une augmentation de l'activité et de la concentration de l'enzyme (Hubacek *et al.*, 2021). Les polymorphismes d'insertion/délétion de l'ECA présentent une variabilité géographique et ethnique significative, la fréquence de l'allèle I étant plus élevée dans les populations asiatiques et africaines que chez les caucasiens (Figure 7) (Hubacek *et al.*, 2021).

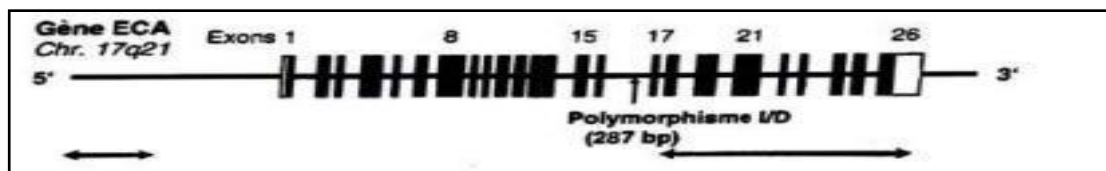


Figure 7 : Représentation schématique de la location du polymorphisme ID du gène ECA (Lefebvre, 2008).

3.3 Polymorphisme de l'ECA et infertilité masculine

Peu d'études ont examiné l'impact des polymorphismes de l'ECA sur l'infertilité masculine et les résultats sont contradictoires (Wang *et al.*, 2019).

Chapitre 5

COVID 19 et infertilité masculine

Le COVID 19 est une maladie respiratoire émergente causée par un nouveau coronavirus-2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) (Rai *et al.*, 2021). Depuis son apparition en Chine en décembre 2019, il s'est répandu dans le monde entier en raison de sa grande capacité de transmission d'une personne à une autre, ce qui a amené l'organisation mondiale de la santé à déclarer officiellement la pandémie mondiale le 12 mars 2020 (Shen *et al.*, 2020).

1. Epidémiologie

Depuis la première flambée en Chine, le virus s'est rapidement propagé dans d'autres parties du monde. À ce jour, le nombre de cas confirmés est d'environ 520 millions (OMS, 2022) et le nombre de décès confirmés est d'environ 6 millions (OMS, 2022).

Des études portant sur des patients hospitalisés ont fait état de taux de létalité allant de 1,4% à 18,9%, et pouvant atteindre 61,5% chez les personnes gravement malades. Les taux de létalité étaient apparemment plus élevés chez les adultes plus âgés et les personnes âgées que chez les jeunes adultes et les enfants. Les taux rapportés incluent 1,0% chez les adultes âgés de 50 à 59 ans, 3,5% chez les 60-69 ans, 12,8% chez les 70-79 ans et 20,2% chez les 80 ans ou plus. Chez les patients gravement malades, la létalité serait plus élevée, atteignant 50% chez les adultes âgés de 40 à 49 ans et 87,5 à 100 % chez les plus de 70 ans (McArthur *et al.*, 2020).

Lorsqu'il s'agit du nombre de cas par région, nous pouvons voir que l'Europe a le plus grand nombre de cas avec 198 millions (37%), suivie de l'Asie avec 158 millions de cas au total, soit (29%), puis de la troisième Amérique du Nord avec 102 millions de cas (19%), l'Amérique latine, l'Afrique et l'Océanie étant les dernières avec un pourcentage de 10%, 2% et 1,5% (OMS, 2022).

2. Mode de transmission

Les virus respiratoires se transmettent entre individus lorsque, le virus est libéré des voies respiratoires d'une personne infectée et est transmis par l'environnement provoquant des infections respiratoires d'une personne exposée et sensible (Leung, 2021). Il existe deux modes de transmission du covid19 : direct (physical) et indirect (fomite). Le mode direct comprend ; les aérosols formés par des procédures chirurgicales et dentaires et/ou la transmission sous forme de noyaux de gouttelettes respiratoires, d'autres fluides corporels et sécrétions, tels que les matières fécales, la salive ; l'urine, le sperme, les larmes...etc. mère et l'enfant. On pense que le SARS-COV-2 se propage généralement par des gouttelettes respiratoires formées lors de la conversation, de la toux et des éternuements d'une personne infectée (Karia, 2020). Le virus qui cause la COVID-19 se transmet principalement lors de

contacts rapprochés entre les personnes à moins de deux mètres de distances et prolongés durant plus de 15 minutes.

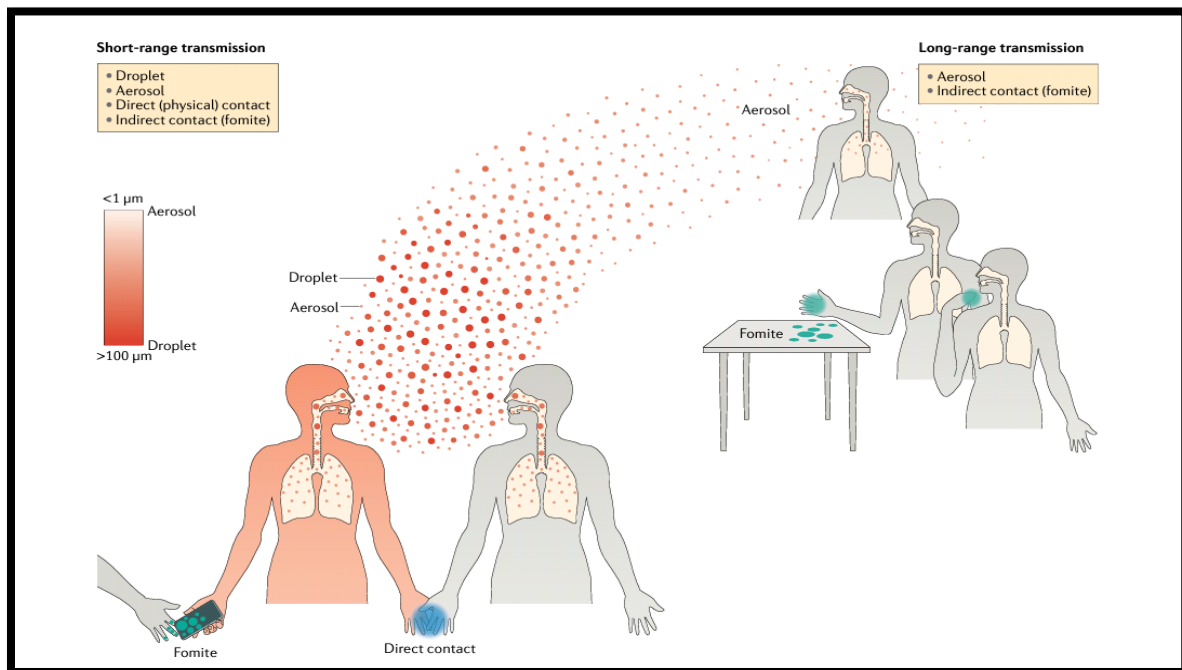


Figure 8 : Les modes de transmissions des virus respiratoires (Leung, 2021).

3. Variantes du SARS COV 2

Les génomes des coronavirus, comme le SARS-CoV-2, peuvent modifier leur séquence génomique pendant la réplication dans les cellules hôtes. Une population de coronavirus qui héritent des mêmes mutations distinctives est appelée un variant. Plusieurs mutations et variantes du SARS-CoV-2 sont apparues dans le monde entier au cours de la pandémie.

Les virus à ARN comme le SARS-CoV-2 mutent plus lentement que la plupart des virus à ARN en raison d'une fonction de relecture pendant la réplication. Les variantes du SARS-CoV-2 ont commencé à apparaître au début du mois de mars 2020. Ayant une seule mutation D614G dans la glycoprotéine de la pointe (S), et les variantes ayant cette mutation ont prédominé depuis juin 2020, probablement en raison de l'amélioration de l'aptitude virale et de la transmissibilité. L'émergence récente de nouvelles variantes du SARS-CoV-2 est un sujet de préoccupation en raison de plusieurs mutations qui se sont produites au cours des dernières années. Ces mutations pourraient avoir un impact sur la structure de la protéine, et ainsi modifier les taux d'infection en modifiant l'interaction de la protéine spike avec le récepteur humain hECA2, modifier la réponse immunitaire ou compromettre l'efficacité du vaccin ou compromettre l'efficacité des traitements par les anticorps monoclonaux.

L'Organisation mondiale de la santé a classé les variantes en "Variantes d'intérêt" (VOI) et "Variantes préoccupantes" (VOC) (Raman *et al.*, 2021).

3.1 Lignée B.1.1.7 (Variante Alpha)

Le variante B.1.1.7 est également connue sous le nom de 20I/501Y.V1. B.1.1.7 a été détecté pour la première fois au Royaume-Uni en décembre 2020 et a été nommé VOC 202012/01 car il a rapidement gagné d'autres pays à un rythme exponentiel (Chand *et al.*, 2020). Les coronavirus de la lignée B.1.1.7 sont de 40 à 83 % plus infectieux que la souche sauvage B1, entraînent des charges virales nasopharyngées plus élevées et provoquent des maladies plus graves (Volz *et al.*, 2021). La lignée B.1.1.7a maintenant été détectée dans plus de 50 pays, dont les États-Unis. Le taux d'infection élevé de B.1.1.7 est attribué à plusieurs mutations dans sa protéine de pointe, dont deux délétions, à savoir H69/V70 et Y144/145, et six substitutions, à savoir N501Y, A570D, P681H/R, T716I, S982A et D1118H (Kemp *et al.*, 2020).

3.2 Lignée B.1.351 (Variante Beta)

Ce variant est également connu sous le nom de 20H/501Y.V2 et a été identifié pour la première fois en Afrique du Sud en décembre 2020 (Tegally *et al.*, 2021). Cette variante a une transmissibilité accrue et est désignée comme un COV puisqu'elle a été détectée en dehors de l'Afrique du Sud, y compris aux États-Unis.

B.1.351 partage la mutation N501Y avec B.1.1.7 dans le domaine RBD de la protéine de pointe. Cette variante présente également deux mutations supplémentaires dans le même domaine RBD (K417N et E484K) qui jouent un rôle central dans l'interaction avec le récepteur et l'évasion immunitaire (Raman *et al.*, 2021).

3.3 Variant P.1 (Variante Gamma)

La variante P.1, également connue sous le nom de 20J/501Y.V3, est une branche de la lignée B.1.1.28 qui a été détectée pour la première fois au Brésil et est devenue une variante dominante dans ce pays (Faria *et al.*, 2021). La variante P.1 a accumulé 12 mutations dans la protéine spike, dont la mutation N501Y, qui est également présente dans B.1.1.7 et B.1.351, tandis que les mutations L18F, K417T, E484K et D614G sont partagées avec la variante B.1.351 (Faria *et al.*, 2021).

3.4 Lignée B.1.617.2 (Variante Delta)

La lignée B.1.617, également connue sous le nom de G/452.V3, a été identifiée pour la première fois dans le Maharashtra, en Inde, en octobre 2020 et est également appelée variante "double mutation". En mai 2021, l'OMS a désigné B.1.617 et ses sous-lignées, à savoir B.1.617.1 (Kappa), B.1.617.2 (Delta) et B.1.617.3, comme "Variant préoccupant". B.1.617 porte de multiples mutations dans la protéine spike, notamment D111D, G142D, L452R, E484Q, D614G, P614R et P681R (Dagan *et al.*, 2021). La " double mutation " fait référence aux mutations de B.1.617 dans la séquence codante de la protéine spike du SARS-CoV-2 à E484Q et L452R, qui sont liées à une transmission et une infectivité accrues. Les mutations E484Q et L452R confèrent à la variante un potentiel de liaison plus fort au récepteur hECA2 ainsi qu'une meilleure capacité à échapper au système immunitaire de l'hôte par rapport aux autres variantes (Deng *et al.*, 2021).

3.5 Variante CAL.20C

Ce variant découvert en Californie constitue les lignées B.1.427 et B.1.429 et porte la mutation L452R. Elle est désignée comme une "variante préoccupante" et s'est répandue aux États-Unis et dans d'autres pays. Elle est caractérisée par les mutations S13I et W152C dans le NTD et par la mutation L452R dans le RBD.

3.6 Variante Omicron

D'après les rapports de l'OMS, la première infection confirmée connue par Omicron pourrait remonter à un spécimen prélevé en novembre 2021. Depuis l'identification d'Omicron, la variante semble se propager rapidement. En outre, l'identification d'Omicron coïncide avec la forte augmentation du nombre de cas confirmés de COVID-19 en Afrique du Sud. Ce nombre a dépassé 2000 en novembre 2021 et a franchi la barre des 10 000 en décembre 2021, En outre, la recherche de la source des cas de COVID-19 a révélé que B.1.1.529 s'était probablement propagé en Europe occidentale avant que les premiers cas ne soient détectés en dans le sud de l'Afrique australe.

L'analyse des séquences génomiques de la variante Omicron a révélé un nombre élevé de mutations non synonymes, dont plusieurs en épi qui se sont avérées être impliquées dans la transmissibilité, la gravité de la maladie et l'échappement immunitaire. Au total, plus de 60 substitutions/délétions/insertions ont été identifiées dans le variant Omicron, ce qui fait de ce dernier le variant possédant le plus grand nombre de sites de mutation parmi tous les variants du SARS- CoV-2 caractérisés jusqu'à présent (He *et al.*, 2021).

4. Symptômes

Une étude observationnelle portant sur 1420 patients atteints d'une maladie légère ou modérée a indiqué que les symptômes les plus répandus étaient les maux de tête (70,3%), la perte d'odorat (70,2%), l'obstruction nasale (67,8%), la toux (63,2%), l'asthénie (63,3%), la myalgie (62,5%), la rhinorrhée (60,1%), le dysfonctionnement gustatif (54,2%), les maux de gorge (52,9%) et la fièvre (45,4%). Le dysfonctionnement olfactif et gustatif a été identifié comme des symptômes courants avec une prévalence regroupée de 52,73% dans dix études (El Aroussi, 2022).

D'après les résultats, la prévalence des symptômes était la plus élevée chez les personnes âgées de 30 à 60 ans ; la présentation atypique la plus courante chez les personnes âgées était la confusion. Chez les enfants, les symptômes les plus fréquemment rapportés sont la fièvre et la toux. Les autres symptômes comprennent des symptômes gastro-intestinaux, des maux de gorge / pharyngite, un essoufflement, une myalgie, une rhinorrhée/congestion nasale et des maux de tête avec une prévalence variable selon les différentes études (El Aroussi, 2022).

Le délai entre l'exposition au Covid-19 et l'apparition des symptômes était en moyenne de 5 à 6 jours, avec une plage de 1 à 14 jours, c'est pourquoi il est conseillé aux personnes qui ont été exposées au virus de rester à la maison et à l'écart des autres pendant 14 jours pour éviter de propager le virus, surtout s'il est difficile à propager.

5. ECA, infections à Covid-19 et infertilité masculine

La rénine, l'ECA-1, l'ECA-2 et l'ECA-3 sont les composants fondamentaux du Système Rénine Angiotensine. Ces dernières années, l'influence du SRA sur différents phénomènes reproductifs a été étudiée. Chez les hommes, on a découvert que le SRA régule la constructibilité tubulaire, la spermatogenèse, la maturation des spermatozoïdes, la capacitation, l'exocytose acrosomique et la capacité de fécondation, tandis que chez les femmes, on a découvert que le SRA maintient la pression sanguine ovarienne et plusieurs voies de signalisation autocrine/ paracrine qui contrôlent la fertilité. La rénine est une aspartyl-protéinase qui catalyse la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine I (ANG-I). L'ANG-I est ensuite clivé en angiotensine II (ANG-II) par l'ECA-1, après quoi l'ANG-II est hydrolysé en angiotensine 1-7 (ANG 1-7) par une mono carboxypeptidase (c'est-à-dire l'ECA-2). L'ANG-II est également produite par l'activité catalytique d'enzymes non liées à l'ECA-2, comme la sérine-protéase Chymase. L'ANG-II est un octapeptide biologiquement actif qui agit par l'intermédiaire du récepteur de type I de l'ANG-II (AT1R) pour favoriser la

vasoconstriction, l'inflammation et le stress oxydatif. Des teneurs plus élevées en ANG-II dans le plasma séminal sont évidentes chez les sujets sous-fertiles. De plus, l'ANG-II affecte négativement le nombre et la morphologie des spermatozoïdes en favorisant l'hypertension vasculaire (Colliet *et al.*, 2019). L'hyperproduction par l'ANG-II de la cytokine pro-inflammatoire IL6 dans les cellules péri tubulaires des testicules est impliquée dans l'infertilité masculine. De manière intrigante, l'ANG-II stimule également la métalloprotéinase-2 (MMP2)/MMP14 par le biais des cascades de signalisation PI3K/AKT et MAPK qui facilitent la prolifération cellulaire et l'angiogenèse. En outre, l'excès d'ANG-II inhibe l'adénylatecyclase dans les cellules de Leydig pour contrer la production de testostérone (Rajak *et al.*, 2021).

L'axe ANG-II/AT1R est également lié et régulé par le nexus moléculaire dépendant de l'ECA-2/Ang 1-7. L'Ang 1-7 agit par l'intermédiaire du récepteur Mas pour réguler la physiologie de la reproduction et la fertilité. La voie de signalisation médiée par l'ECA-2/Ang 1-7/Mas contrôle la stéroïdogénèse, la contractilité de l'épididyme et la motilité des spermatozoïdes (Rajak *et al.*, 2021).

Malheureusement, l'infection par le coronavirus peut réguler à la baisse les récepteurs de l'ECA-2, ce qui entraîne une réduction de la conversion de l'ANG-II en Ang 1-7 et une accumulation excessive d'ANG-II. Le coronavirus module l'expression de l'ECA-2 par l'endocytose du complexe récepteur-ligand ou par l'activation de l'enzyme de conversion du TNF- α (TACE), qui permet la libération de l'ectodomaine du récepteur. Cela profite paradoxalement aux virions en ce qui concerne leur réplication et leur conditionnement à l'intérieur de la cellule hôte. Par conséquent, la perturbation par les coronavirus de l'axe ECA-2/Ang 1-7/Mas pourrait nuire à la physiologie reproductive normale et à la fertilité des hommes et des femmes (Rajak *et al.*, 2021).

6. Impact du SARS-COV 2 sur l'ECA 2 sue le système reproductif masculin

Les premières données épidémiologiques suggèrent que le principal mode de transmission se fait par les gouttelettes respiratoires, mais le SARS-COV-2 a été trouvé dans d'autres fluides corporels tels que les matières fécales, l'urine et le sperme. A la suite de ces découvertes des questions ont été soulevées sur le potentiel d'excrétion virale et de transmission par le sperme, en plus des effets possibles sur la fertilité masculine (Best *et al.*, 2021).

Des hommes infectés par le SARS-COV-2 ont été comparés à des hommes en bonne santé en âge de procréer en Chine pour voir comment leurs niveaux d'hormones sexuelles changeaient. L'hypogonadisme et la mort des cellules stromales ont été suggérés en raison d'un rapport réduit entre la testostérone et l'hormone lutéinisante (LH). Il convient de mentionner que les effets possibles de certains traitements (par exemple ; les corticoïdes) sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique devait être pris en compte. Dans une autre étude, la fièvre était associée à des lésions testiculaires dues à la perte de cellules germinales dans un environnement à haute température, à la perte de cellules de Leydig et à une infiltration leucocytaire due à une diminution des niveaux de testostérone (Al-Khikani *et al.*, 2022).

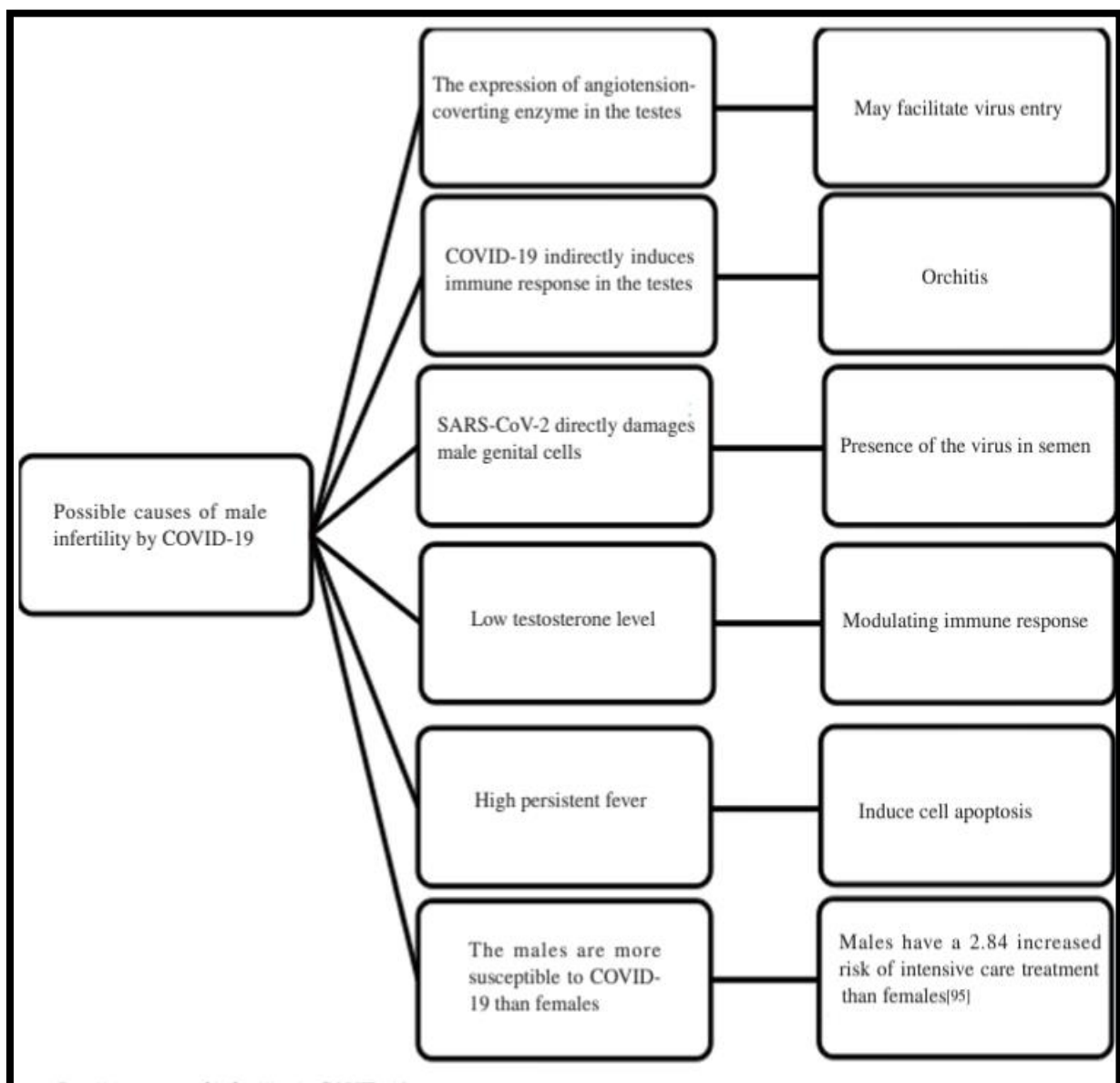


Figure 9 : Les causes possibles de l'infertilité dans COVID-19 (Al-Khikani et Ayit, 2022).

6.1 Rôle des médiateurs COVID-19 sur la FIV et d'autres ART

Les techniques de reproduction médicalement assistées ART, dont la FIV et l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI), sont actuellement utilisées pour traiter l'infertilité. Cependant, dans le cas d'échantillons de sperme présentant des dommages importants au niveau de l'ADN, ces techniques peuvent ne pas être aussi efficaces. Parfois, les spermatozoïdes endommagés entraînent des taux élevés de fausses couches après l'ICSI. Les hommes infertiles ne parviennent pas non plus à initier une grossesse après des ART, ce qui pourrait être dû à des spermatozoïdes défectueux. Les défauts dans les spermatozoïdes peuvent également être causés par le stress oxydatif séminal.

L'infection par le SARS-CoV-2 bloque les récepteurs ECA-2 et augmente le niveau d'ANG-II. Des niveaux élevés d'ANG-II folliculaire sont associés au développement d'un syndrome d'hyperstimulation ovarienne sévère chez les patientes subissant une procédure de FIV. Chez les hommes, un taux excessif d'ANG-II inhibe l'adénylatecyclase dans les cellules de Leydig, ce qui réduit la production de testostérone. Notamment, le SRA est également responsable du maintien des électrolytes du plasma séminal, de la régulation de la stéroïdogénèse, de la spermatogénèse et des fonctions des spermatozoïdes; cependant, une perturbation du SRA peut altérer ces processus et affecter les cycles de FIV/ICSI (Rajak *et al.*, 2021).

Partie pratique

Patients et méthodes

1. Patients et méthodes

1.1 Type d'étude

L'étude que nous avons entreprise est de type cas-témoins qui a été réalisée sur deux populations : une population de 10 témoins hommes fertiles et une population de 11 patients infertiles. Elle a duré un mois et a été accomplie au niveau de la clinique PMA Ibn Rochd (Recrutement des patients infertiles) et au niveau du laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire (Extraction d'ADN) ainsi que le laboratoire de biologie moléculaire de la faculté SNV de l'UFMC 1 (PCR).

1.2 Recrutement des patients infertiles

1.2.1 Critères d'inclusion

Sont inclus dans cette étude tous les patients présentant un spermogramme anormal : azoospermie, oligospermie, asthénospermie ou tératozoospermie.

1.2.2 Critères d'exclusion

En patients avec une infertile idiopathique.

1.3 Recrutement des témoins

Le recrutement des témoins est basé sur des paramètres spermatiques normaux. Au total, nous avons recruté 10 échantillons de sang d'hommes fertiles.

2. Méthodes

2.1. Questionnaire

Un questionnaire a été réalisé afin d'enregistrer toutes les informations nécessaires à notre étude à savoir : l'âge, le sexe, les données cliniques et les antécédents personnels et familiaux.... (Annexe 1). Un interrogatoire minutieux est mené près des patients sélectionnés dans notre étude pendant une entrevue durant 10 à 15 minutes.

2.2. Prélèvement sanguin

Chaque patient a subi une prise de sang pour ponction veineuse périphérique sur deux tubes EDTA vacutainer de 4 ml (si nécessaire on procède à une conservation au réfrigérateur à +4°C). Le prélèvement de sang a été réalisé au niveau du pli du coude après la pose d'un garrot par des professionnels de la santé (Infirmier(e)s). Les patients doivent être en position demi-assise. Les tubes portent des étiquettes portant les noms et prénoms des sujets ainsi que la date du prélèvement.

3. Étude moléculaire

Notre étude moléculaire s'est effectuée selon deux étapes : une étape d'extraction de l'ADN suivie d'une PCR (polymerase chain reaction) pour la recherche du polymorphisme ID du gène *ECA*.

3.1 Extraction de l'ADN (Technique au NaCl)

3.1.1 Principe

Une lyse hypotonique des leucocytes est faite en utilisant une solution à base du Tris et de l'EDTA (TE) et traités ensuite par un détergent (SDS) et une protéinase K. L'ADN nucléaire libéré dans le milieu et les protéines qui lui sont associés sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl, la pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol absolu.

3.1.2 Préparation des leucocytes

- Dans un tube flacon de 50 ml, mettre le sang et compléter à 50 ml avec du TE 20:5 laisser 10 min dans la glace.
- Centrifuger 10 min à 3900g (3800 rpm).
- Aspirer le surnageant avec la trompe à vide.
- Ajouter quelques ml de TE 20:5 au culot, le remettre en suspension avec une pastille stérile.
- Compléter à 25 ml avec du TE 20:5 et laisser 10 min dans la glace.
- Centrifuger dans les mêmes conditions que la première fois.

3.1.3 Extraction de l'ADN

- Transvaser le culot de leucocytes dans un tube Flacon de 15 ml
- Ajouter 3ml de tampon de lyse (NaCl 400 Mm. EDTA 2Mm Tris 10Mn pH 8,2).
- Ajouter 200 µl de SDS à 10%.
- Ajouter 100µl de protéinase K à 10mg/ml.
- Agiter le tube sur une roue à 37°C une nuit.
- Le lendemain refroidir dans la glace.
- Ajouter 1 ml de NaCl 4 M et agiter vigoureusement à la main.
- Remettre 5 min dans la glace (précipitation des protéines).
- Centrifuger pendant 15 min à 2500 tpm.
- Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml, puis ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu (100%) préalablement refroidi et agiter en tournant le tube

plusieurs fois : la pelote d'ADN s'est formée, visible à l'œil nu (laisser le tube éventuellement 30 min à -20°C si la pelote d'ADN ne se forme pas).

- Récupérer la pelote d'ADN par une pipette pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70% dans un tube Eppendorf stérile.
- Mettre la pelote dans un tube nunc.

3.1.4 Solubilisation de l'ADN

Notre ADN est réhydraté en ajoutant entre 300-1000 μl de TE : 10:1 selon la grosseur de la pelote et la concentration qu'on souhaite avoir. Laisser les tubes pendant une nuit sur agitateur rotateur à 37°C , puis à température ambiante jusqu'à dissolution (1 à 2 jours).

3.2 PCR

La PCR, réaction de polymérisation en chaîne, est une technique permettant d'obtenir, à partir d'un échantillon d'ADN, d'importantes quantités d'une séquence d'ADN spécifique. Cette amplification repose sur la réplication d'une matrice d'ADN double brin. Elle se réalise en trois phases : une phase de dénaturation, une phase d'hybridation avec des amorces et une phase d'élongation. Les produits de chaque étape de synthèse servent de matrice pour les étapes suivantes, ainsi on réalise une amplification exponentielle.

3.2.1 Première étape : dénaturation thermique

Cette étape consiste à séparer par la chaleur les deux brins en rompant les liaisons hydrogènes. L'ADN double brin est chauffé à 94°C . Cette température est supérieure à la température de dénaturation (Température melting ou T_m) de l'ADN qui passe alors sous forme simple brin. Ces brins servent de matrice au cours des cycles d'amplification.

3.2.2 Deuxième étape : hybridation des amorces ou « annealing »

Le milieu réactionnel est amené à une température inférieure au T_m des amorces. Cette T_m est en fonction de la séquence et la richesse en GC de l'amorce et est en général de l'ordre de 45 à 70°C . Les amorces en large excès, s'hybrident à tout l'ADN simple brin comportant la séquence complémentaire.

3.2.3 Troisième étape : élongation et extension d'amorce

Une ADN polymérase (Taq polymérase) allonge les amorces en y incorporant les désoxynucléotides complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle est hybridée. La synthèse s'effectue dans le sens $5' \rightarrow 3'$ à une température optimale. A la fin du cycle, deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues. Un nouveau cycle commencera par

l'étape de dénaturation, suivie successivement des étapes d'hybridation et d'extension. A chaque cycle correspond le doublement du nombre de copies de la séquence cible. De manière générale 25 à 40 cycle sont effectués, générant un nombre considérable de copies de la séquence cible. L'amplification est exponentielle selon la formule 2^n à la puissance n, n représente le nombre de cycles, par exemple une PCR de 30 cycles génère théoriquement 2^{30} copies de cibles initialement présentes.

3.2.4 Préparation du milieu réactionnel de la PCR

Un milieu réactionnel de la PCR ou un mix de PCR d'un volume final de 10 μ l a été préparé. Le mix comprend des désoxyribonucléotides triphosphates, une enzyme d'amplification *in vitro*, un environnement réactionnel (tampon, MgCl₂, H₂O) et deux amorces oligonucléotidiques correspondant au polymorphisme ID du gène *ECA*. Pour cette étape, les réactifs utilisés dans la PCR doivent d'abord être dilués selon la formule suivante :

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Sachant que :

C1 : concentration initiale de chaque réactif (mentionnée sur le tube).

V1 : volume initial requis pour la dilution (inconnu).

C2 : concentration finale (mentionnée dans le protocole utilisé).

V2 : volume final (en fonction du nombre de tubes).

$$V1 = C2 \times V2 / C1$$

Le volume de chaque réactif est ensuite multiplié par le nombre de tubes (nombre d'individus), plus deux tubes (témoin négatif et positif). Une fois que le volume initial (V1) est connu, le volume de l'eau distillée nécessaire pour la dilution de chaque réactif est calculé comme suit :

$$V2 - V1 = V \text{ eau distillée}$$

Tableau III : Quantités de chaque constituant du milieu réactionnel de la PCR du gène *ECA*.

Réactif	Vol/tube (μ l)
Eau distillée (H ₂ O)	4,02
dNTP (0,2 final)	1,6
MgCl ₂ (à 1,5 final 50 Nm)	0,3
Tampon 10X	1
Amorce F (sens 100 ng/ μ l)	1
Amorce R (anti-sens 100 ng/ μ l)	1
Taq polymérase 5U/ μ l	0,08
ADN 20 à 50 ng/ μ l	1

Tableau IV : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de la région 3' non codante du gène *ECA*.

Les amorces	Séquence nucléotidique
<i>ECA</i> 1F (Forward)	5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGAT-3'
<i>ECA</i> 1R (Reverse)	5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3'

Selon le nombre d'échantillons, le mix de la PCR est préparé (tableau 3), nous avons pris 9 μ l de ce mélange avec 1 μ l d'ADN dans chaque tube de PCR pour chaque sujet. Les conditions pour le déroulement des cycles d'amplification par PCR sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau V : Conditions de PCR pour le gène *ECA*.

Nombre de cycles	Étapes	Température (°C)	Durée
n = 35	Dénaturation initiale	94	30 min
	Dénaturation	94	30 s
	Hybridation	67	30 s
	Elongation	72	30 s
	Elongation finale	72	4 min

3.2.5 Contrôle des produits de la PCR

Il nous permet de vérifier le bon déroulement de la technique de PCR et de vérifier une éventuelle contamination de l'ADN (grâce au témoin négatif). Ce contrôle est assuré par une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% sur une cuve horizontale. Le gel est préparé en mélangeant 2 g d'agarose avec 100 ml du TBE 1X (Tris Borate EDTA) additionné de 10 μ l du BET (Bromure d'éthidium).

Après avoir dissout l'agarose dans le microonde, le gel est déposé sur une plaque d'une cuve horizontale où l'on a déposé un peigne pour créer des puits de dépôt. Nous laissons le gel se polymériser à l'air libre.

3.2.6 Migration électrophorétique et révélation de la PCR

Dans chaque puits du gel, la quantité de 10 μ l du produit de PCR mélangée à 2 μ l du bleu de bromophenol a été déposée. Ce dernier permet de suivre le front de migration. Parallèlement un échantillon sans ADN (blanc), est inclus dans la série à amplifier et sert de contrôle négatif (-).

Un marqueur de poids moléculaire 100 pb est déposé dans le dernier puits pour déterminer la taille des fragments.

Le dépôt se fait du côté cathode (-) et le système est soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 1 heure.

Après la migration, le gel est soumis au rayonnement UV dans un Transilluminateur.

Les molécules du BET fixées à l'ADN émettent une lumière visible (fluorescence) et photographie et permettent de visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes.

Le profil électrophorétique doit montrer une bande de 490 pb, correspondant au génotype homozygote (insertion) I/I, une bande de 190 pb correspondant au génotype homozygote (délétion) D/D, et deux bandes de 190 et 490 pb pour le génotype hétérozygote I/D (Figure 8).

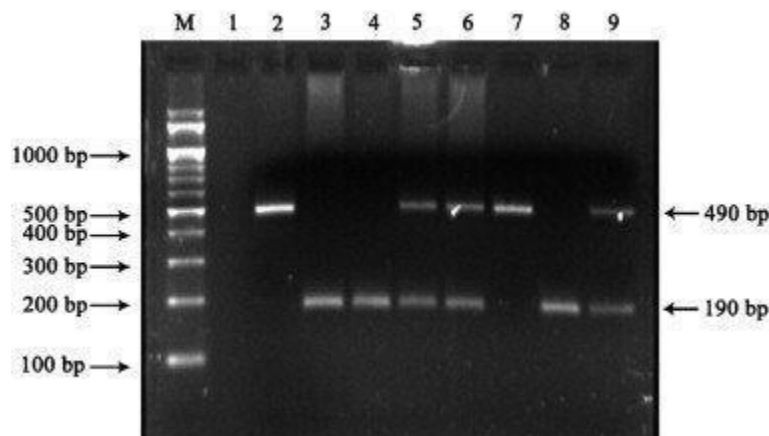


Figure 10: Électrophorèse sur gel d'agarose, montrant le schéma d'amplification du polymorphisme du gène *ECA* (I/D) (Vijayan *et al.*, 2014).

M représente le marqueur de taille de 100 pb. La piste 1 représente le contrôle négatif. Les pistes 2 et 7 montrent le génotype II (produit 490 pb), les pistes 5, 6 et 9 montrent le génotype ID (produits 490 et 190 pb) et les pistes 3, 4 et 8 montrent les génotypes DD (produit 190 pb).

4. Analyse statistique

Afin de confirmer l'existence d'un lien cohérent entre le polymorphisme Insertion/Délétion du gène *ECA* et l'infertilité masculine pour des patients ayant eu la COVID 19, de nombreuses approches et tests ont été réalisés. Nous avons utilisé le logiciel Epi info version 6.0 pour le calcul des OR et des *p-value*.

4.1 Odds ratio (OR)

L'odds ratio (OR), est employé dans les études cas-témoins marquées par impossibilité de mesurer les risques de la maladie chez les sujets exposés et les non exposés. Il s'agit d'une mesure de l'association entre une exposition et un résultat pour déterminer si une exposition particulière est un facteur de risque pour un résultat particulier, et pour comparer l'ampleur de divers facteurs de risque pour ce résultat. Pour calculer l'OR nous avons établi le tableau de contingence suivant :

Tableau VI : Tableau de contingence

	Patients	Témoins	Total
Exposé	a	b	a + b
Non exposé	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

Où :

a = nombre de patients exposés

b = nombre de contrôles exposés

c = nombre de patients non exposés

d = nombre de contrôles non exposés

Le rapport impair est calculé par la formule ci-dessous :

$$OR = a/c / b/d = a*d/b*c$$

OR = 1 L'exposition n'affecte pas les chances de résultat.

OR > 1 L'exposition associée à des chances de résultat plus élevées.

OR < 1 L'exposition associée à une moindre probabilité de résultat.

4.2 Intervalle de confiance

Il représente le niveau de certitude des résultats de la recherche. Il nous permet de calculer la marge d'erreur de l'échantillon sélectionné afin d'estimer le résultat réel à 95%. Plus cet échantillon est grand, plus il est représentatif, plus l'intervalle de confiance est faible, plus le résultat de l'enquête est précis. Les limites de confiance sont les deux valeurs qui définissent l'intervalle. L'utilisation d'une proportion fixe de 95% est purement arbitraire. Certains auteurs utilisent un intervalle de confiance de 90% ou 98%.

Résultats et discussion

Un total de 21 sujets a été inclus dans notre étude, il s'agit de 11 patients infertiles qui ont été positif pour le COVID-19 et 10 sujets fertiles également positifs pour le COVID-19.

1. Caractéristiques des patients

Nous avons pu recueillir les données clinico-biologiques relatives au 11 patients infertiles, un prélèvement sanguin destiné à l'analyse moléculaire a été également effectué.

1.1 Répartition de la population d'étude selon l'âge

Tableau VII : Répartition des patients selon la tranche d'âge.

Tranche d'âge	Infertile	%	Témoins	%
[25 - 35] ans	4	36,36%	5	50%
[36 - 46] ans	6	54,55%	4	40%
[47 - 57] ans	1	9,09%	0	0%
[58 - 68] ans	0	0%	1	10%
Total	11	100%	10	100%

L'âge moyen des hommes infertiles est de 43 ans avec des extrêmes allant de 32 à 53 ans. L'âge moyen des témoins est de 31 ans avec des extrêmes allant de 26 à 62 ans. D'après la répartition selon l'âge, nous pouvons dire que l'âge n'a pas d'impact sur les paramètres spermatiques dans notre population d'étude. Conformément à nos résultats, Boulegue *et al.* (1999) ont rapporté qu'entre 20 et 60 ans, les paramètres essentiels de spermogramme semblent, en moyenne, indépendants de l'âge, ce qui permet de penser que la qualité de l'éjaculat est conservée jusqu'à 50/60ans. Cependant, les études de Carlsen *et al.* (1990) ont déclaré des altérations de la qualité du sperme dans la population des hommes fertiles. Celles-ci concernaient la numération (113 millions par ml en 1940 versus 66 millions en 1990). De même, Matumo *et al.* (2020) ont signalé une incidence croissante d'anomalies du spermogramme selon l'âge.

1.2 Répartition de la population d'étude selon la consommation du tabac

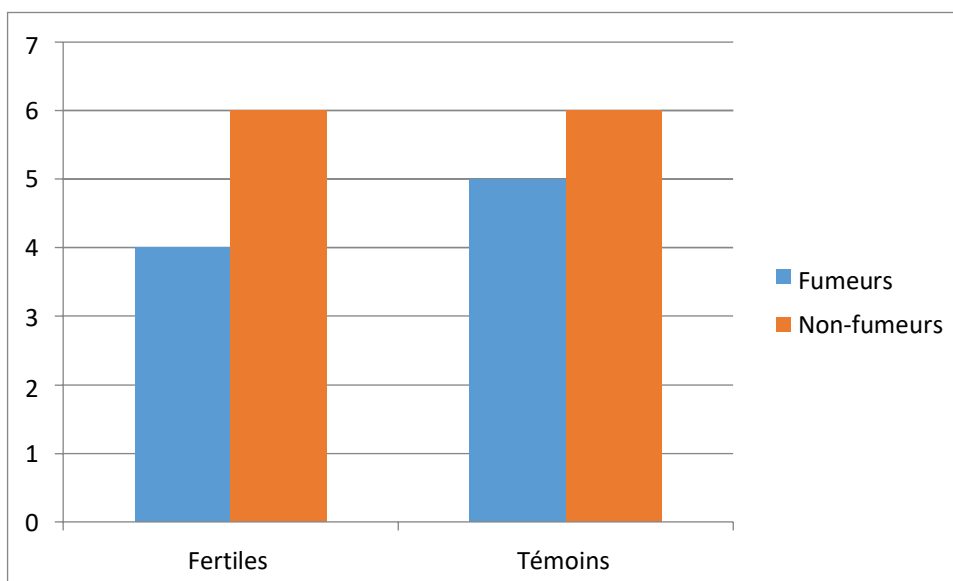


Figure 11: Répartition des patients selon la consommation du tabac.

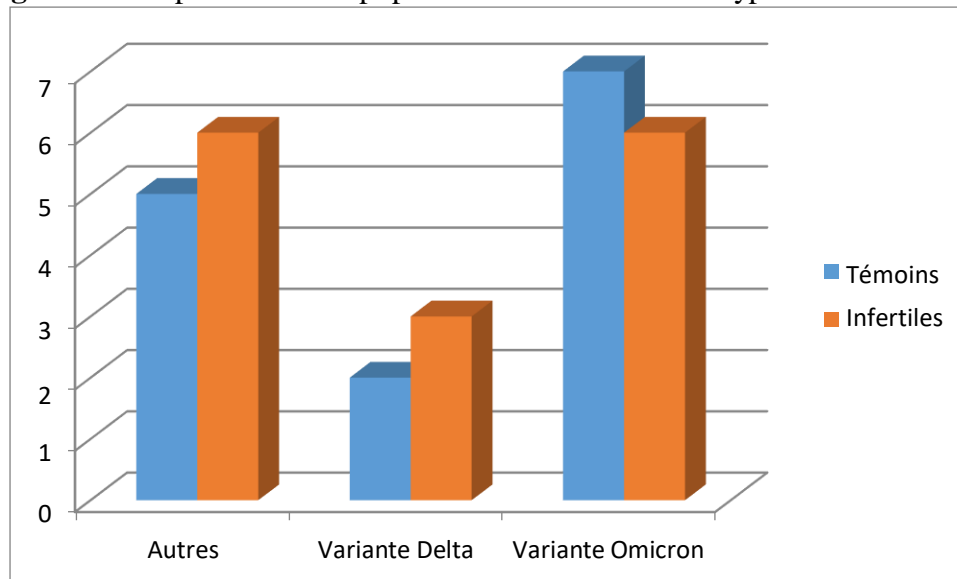
D'après l'histogramme, nous pouvons constater une répartition similaire des fumeurs et non fumeurs pour les deux groupes étudiés. Vu la taille de l'échantillon très réduite nous ne pouvons tirer des conclusions par rapport à l'influence du tabac sur les paramètres spermatiques.

Plusieurs études précédentes ont examiné l'effet du tabac sur les paramètres spermatiques mais les résultats sont contradictoires (Asare-Anane *et al.*, 2016). Asare-Anane *et al.* (2016) ont montré que les fumeurs avaient un volume de sperme, une concentration, une motilité, un nombre total et une morphologie des spermatozoïdes, une testostérone libre et une hormone folliculo-stimulante significativement plus faibles que les non-fumeurs. Les fumeurs avaient un risque plus élevé de développer une oligospermie, une asthénozoospermie et une tératozoospermie que les non-fumeurs. Similairement, Tang *et al.* (2019) ont déclaré que le tabagisme a été associé à une diminution du volume du sperme et du nombre total de spermatozoïdes, ainsi qu'à une augmentation de la motilité des spermatozoïdes. Une méta-analyse entreprise en 2019 (Bundhun *et al.*, 2019) a également confirmé que le tabagisme est associé à une diminution du nombre de spermatozoïdes et à une augmentation du nombre de défauts morphologiques des spermatozoïdes. Cependant, le pH et la motilité des spermatozoïdes ainsi que la production d'hormones impliquées dans la reproduction n'ont pas été affectés dans cette population d'hommes infertiles.

1.3 Répartition de la population d'étude selon le type du Covid-19

Nous avons effectué une répartition des sujets recrutés selon les variantes du COVID 19.

Figure 12 : Répartition de la population d'étude selon les types du Covid-19.



Selon l'histogramme, les deux groupes étudiés ont été atteints par les mêmes variantes de COVID 19. La comparaison des paramètres spermatiques des deux groupes n'a pas montré de différences remarquables. Cela peut être dû à la taille de l'échantillon très réduite.

Depuis la pandémie, beaucoup d'étude ont essayé d'examiner l'impact du COVID 19 sur plusieurs pathologies, y compris la fertilité masculine et féminine. Moshrefi *et al.* (2021) a essayé de résumer la compréhension actuelle des mécanismes probables et des allégations d'effets indésirables du SARS-CoV-2 sur le potentiel de la fertilité masculine. Ces auteurs ont conclu que la fertilité masculine peut être perturbée après l'infection par le SARS-CoV-2. De même, Rajak *et al.* (2021) ont suggéré que les organes reproducteurs sont sensibles à l'agression pathogène et peuvent donc être ciblés par l'infection par le SARS-CoV-2. L'excrétion d'ECA-2, l'augmentation des taux de cytokines, le stress oxydatif et l'élévation de la température corporelle induits par le SARS-CoV-2 sont autant de menaces potentielles pour la santé et la et la physiologie de la reproduction. L'isolement social, le confinement et l'insécurité professionnelle due à l'épidémie de COVID-19 ont également invité la population générale à subir un stress mental léger à sévère, ce qui pourrait mettre en péril la fertilité et la reproduction. En raison de la présence de facteurs d'entrée du SARS-CoV-2 dans divers tissus reproducteurs, les virions peuvent envahir les organes

reproducteurs et perturber l'efficacité de la fertilité pour les couples qui prévoient de concevoir un enfant dans un avenir proche (Rajak *et al.*, 2021).

Carneiro Gomes *et al.* (2021) ont également étudié les implications possibles de COVID-19 sur les systèmes reproducteurs humains et ont constaté la présence de matériel génétique viral dans le sperme et une augmentation de la concentration sérique de l'hormone lutéinisante (LH) chez l'homme, ce qui pourrait provoquer un hypogonadisme.

Dans le même contexte, Sengupta *et al.* (2021) ont recommandé une évaluation clinique de l'appareil reproducteur masculin, des paramètres séminaux et des hormones de reproduction chez les patients présentant un COVID-19 actuel ou antérieur, en particulier chez les hommes qui suivent un traitement de fertilité.

2. Résultats de l'étude moléculaire

Après avoir fait l'extraction d'ADN et la PCR du polymorphisme ID du gène *ECA*, nous avons contrôlé les produits de PCR sur gel d'agarose à 2% et les résultats obtenus sont représentés ci-dessous.

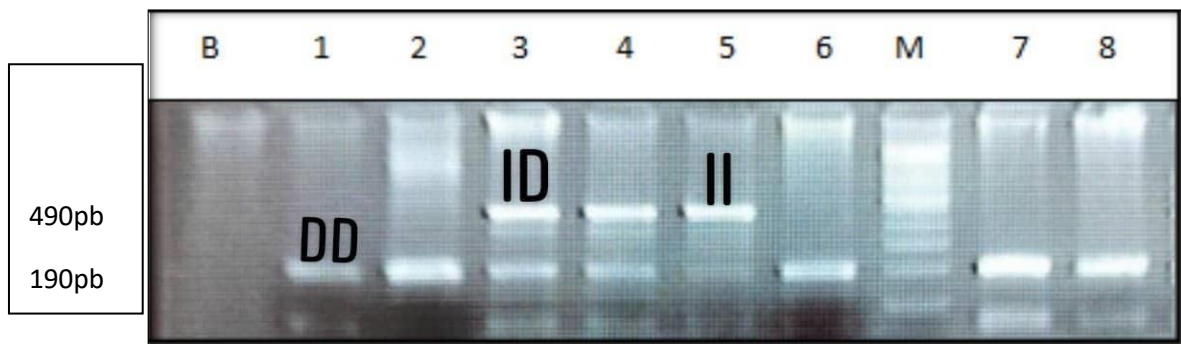


Figure 13 : Profil d'électrophorèse de la PCR du polymorphisme ID du gène *ECA*. La Taille du fragment amplifié est de 190pb. B : blanc ; 1-8 : patients ; M : marqueur de taille de 100pb.

Les génotypes qui ont été obtenus sont :

- L'homozygote « DD » est caractérisé par la présence d'une seule bande de 190pb (patients 1,2,6,7,8).
- L'hétérozygote « DI » est précisée par la présence de deux bandes de 490pb et 190pb (patients 3 et 4).
- L'homozygote « II » est présenté par une seule bande de 490pb (patient 5).

2.1 Répartition des fréquences génotypique et alléliques du polymorphisme ID du gène *ECA*

Les résultats du génotypage du variant ID du gène *ECA* sont rapportés dans le tableau 8.

Tableau VIII : Comparaisons des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme ID du gène *ECA* chez les patients et les témoins.

ECA	Patients		Témoins		OR (95%CI)	P value
	n	%	n	%		
Co-dominant						
del/del	6	54,55	4	40		
ins/del	4	36,35	6	60	0,44 [0,05-3,70]	0,65
ins/ins	1	9,09	0	0	Indéfini	0,76
Allèles						
del	16	72,73	14	70		
ins	6	27,27	6	30	0,88[0,19-4,06]	0,88

Selon les résultats obtenus, le génotype homozygote sauvage (DD) est le prédominant dans la population malade avec une fréquence de (54,55%) par rapport aux témoins (40%). Alors que le génotype hétérozygote (ID) des témoins (60%) est plus fréquent que dans la population malade (36,35%). Cependant, la fréquence du génotype homozygote muté (II) chez les malades est de 9,09% contre 0% chez les témoins. Au même titre que le génotype DD, l'allèle D est le plus représenté dans les deux groupes patients et témoins, avec des fréquences respectives de 72,73% et de 70% versus 27,27% et 30% pour l'allèle I.

Nos résultats concordent avec ceux publiés par Kucera *et al.* (2001) qui ont montré que la fréquence de l'allèle D (52,2%) est plus élevée chez les hommes avec des pathologies spermatiques que les hommes fertiles (44,9%), les calculs statistiques n'ont présenté aucune différence significative entre les deux groupes ($p = 0,15$). Le polymorphisme d'insertion/délétion du gène *ECA* est associé à des changements dans les concentrations de protéines plasmatiques.

Contrairement aux résultats obtenus, Zalata *et al.* (2012) ont suggéré que le polymorphisme d'*ECA* est un facteur de risque pour l'infertilité masculine dont le polymorphisme I/D du gène *ECA* est associé à des variables séminales anormales, de sorte que les porteurs du génotype de délétion/délétion *ECA** présentent un stress oxydatif séminal plus élevé.

La présence de l'allèle D entraîne une augmentation des taux plasmatiques de cette protéine, ce qui entraîne par la suite une augmentation des taux d'angiotensine II et une altération de la synthèse des hormones stéroïdes (Cintra *et al.*, 2018).

Les connaissances actuelles concernant le lien entre le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2) et le système rénine-angiotensine (SRA) dans l'appareil reproducteur masculin sont encore limitées. Les préoccupations concernant les conséquences de l'infection par le SARS-CoV-2 sur la fertilité masculine ont commencé à émerger, depuis que des études épidémiologiques ont observé que ce coronavirus affecte les patients masculins plus fréquemment et avec une gravité accrue, peut-être en raison de l'expression régulée par les hormones du récepteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ECA2). Une perturbation de la fertilité est également attendue sur la base des études de l'infection précédente par le CoV du SARS, qui cible le même récepteur ECA2 lorsqu'il pénètre dans les cellules hôtes (Pascolo *et al.*, 2020).

Des études récentes ont essayé d'examiner d'éventuelles corrélations entre le polymorphisme ID du gène *ECA1* et la sévérité d'atteinte par le COVID 19 mais les résultats restent discutables (Delanghe *et al.*, 2020 ; Aladag *et al.*, 2021 ; Gunal *et al.*, 2021 ; Verma *et al.*, 2021 ; Yamamoto *et al.*, 2021 ; Papadopoulou *et al.*, 2022).

Les statistiques ont montré une sensibilité accrue des hommes à l'infection par le SARS-CoV-2 qui un rôle de : bloquer les récepteurs ECA-2 et augmente les niveaux d'ANG-II. Chez les hommes, l'excès d'ANG-II inhibe l'adénylate cyclase dans les cellules de Leydig, réduisant ainsi la production de testostérone. Notamment, le RAS est également responsable du maintien des électrolytes plasmatiques séminaux, de la régulation de la stéroïdogenèse, de la spermatogenèse et de la fonction des spermatozoïdes. Cependant, la perturbation du RAS peut altérer ces processus et affecter le cycle de FIV/SCI (Rajak *et al.*, 2021).

Conclusion et perspectives

La génétique de l'infertilité est un domaine très vaste. La connaissance de la structure du génome humain obtenue à partir d'études sur un grand nombre de sujets affectés par l'infertilité a identifié plusieurs gènes associés à ce problème. Parmi ces gènes, le gène *ECA* dont les polymorphismes sont recherchés depuis plusieurs années en association avec plusieurs pathologies y compris l'infertilité masculine.

Notre travail de recherche avait pour but d'étudier l'implication de certains facteurs de risque (Tabac, COVID 19) sur les paramètres spermatiques des hommes fertiles et infertiles dans la population algérienne d'une part et de rechercher d'éventuelle association entre le polymorphisme I/D du gène *ECA* et l'infertilité masculine.

Vu la taille de l'échantillon très réduite nous n'avons pas pu tirer des conclusions sur l'impact de l'âge, du tabagisme et du COVID 19 sur les paramètres spermatiques et la fertilité masculine dans notre population d'étude.

L'exploration génotypique du polymorphisme I/D de l'*ECA* n'a pas révélé de différences significatives quant à la distribution des fréquences génotypiques et alléliques entre le groupe patients et le groupe témoins ($P > 0,05$). Mais ces résultats restent préliminaires et ne peuvent être concluants sauf si la taille de la population d'étude sera plus importante.

Comme perspectives de notre travail, nous proposons :

- étendre l'étude sur un nombre de patients plus conséquent permettant un traitement statistique des données afin de dégager des corrélations entre les paramètres mis en causes la pathologie étudiée.
- d'élargir la taille de l'échantillon étudié, pour continuer l'étude sur le gène *ECA*, ce qui va permettre de mieux comprendre l'étiologie et peut mener à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques et de diagnostic de cette pathologie.
- étudier l'effet du COVID 19 sur l'altération des paramètres spermatiques et de vérifier lequel des génotypes de l'*ECA* est le facteur de risque prédisposant.

Références bibliographiques

- Abroulaye FO, Noel CO, Michel TL, et al.** Men related factors in couple infertility. *Revintscméda*. 2021 ;23 :80-85.
- Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, et al.** Male infertility, *The Lancet*. 2021 ;397 :319-333.
- Ahmed F et Hughe LA.** The genetics of male under masculinization. *Clinic Endo*. 2002; 56:1-18.
- Akcan AB et Boduroglu OK.** Y chromosomematerial in turner syndrome. *Emerg Top Life Sci*. 2021; 5:427-441.
- Aladag E, Tas Z, Ozdemir BS, et al.** Human Ace D/I Polymorphism Could Affect the Clinicobiological Course of COVID-19. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2021 ;15 :5509280.
- Al-Khikani FHO et Ayit AS.** A scoping review of SARS-COV-2 and male infertility: concerns and future prospects. *Asian Pac J Reprod*. 2022 ; 11 :53-61.
- Alsayed BA et Mir R.** Severe COVID-19 Pneumonia and Genetic Susceptibility: A Case Report and Literature Review. *Cureus*. 2022 ;14.
- Anawalt BD.** Approach to Male Infertility and Induction of Spermatogenesis. *The J of Clinic Endo & Metabolism*. 2013 ; 98 : 3532–3542.
- Arafa M, Elbardisi H, Majzoub A, et al.** Genetics of Male Infertility: A Case-based Guide for Clinicians. *Springer Nature*. 2020 ;14.
- Barthelemy J.** Effets d'une exposition au tributylétain sur le système reproducteur male these. Québec, Université du Québec, institut national de la recherche scientifique, doctoratenbiologie. 2006; 1:9-11.
- Bearely P et Oates R.** Recent advances in managing and understanding Klinefelter syndrome. *F 1000 Research*. 2019; 8:112.
- Best JC, Kuchakulla M, Khodamoradi K, et al.** Evaluation of SARS-COV-2 in Human Semen and effect on total sperm number: A prospective observational study. *World J Men's Health*. 2021 ; 39 :489-495.
- Bloem LJ, Manatunga AK, et Pratt JH.** Racial difference in the relationship of an angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism to serum angiotensin converting enzyme activity. *Hypertension*. 1996.
- Boulegue D, Janny L, Pouly JL et al.** Fertilité de l'homme en fonction de l'âge. *Androl*. 1999 ;9 :28–41.

Brannstrom M, Zackrisson U, Hagstrom HG, et al. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertil Steril. American Society for Reproductive Medicine Published by Elsevier Science Inc.* 1998 ;69 :435–442.

Calvier L. La Galectine-3, médiateur des effets de l'aldostérone sur le remodelage cardiovasculaire. *Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français.* <NNT : 2012LORR0122>. <Tel-01749321>

Carneiro Gomes PR, Rodrigues da Rocha MD, da Rocha Coelho FA, et al. Alterations of the male and female reproductive systems induced by COVID-19. *Wien Klin Wochenschr.* 2021 ;133 :966-972.

Chand GB, Banerjee A, Azad GK. Identification of novel mutations in RNA-dependent rnapolymerases of sars-cov-2 and their implications on its protein structure. *Peer J* 2020 ;8.

Cintra MTR, Balarin MAS, Tanaka SCS, et al. Polycystic ovarian syndrome : rs17997752 polymorphism of ACE gene. *Revista Da Associacao Médica Brasileira.* 2018 ; 64 : 1017-1022.

Colli LG, Belardin LB, Echem C, et al. Systemic arterial hypertension leads to decreased semen quality and alterations in the testicular microcirculation in rats. *SciRep.* 2019 ;9 :11047.

Dagan N, Barda N, Kepten E, et al. Bnt162b2 mrna covid-19 vaccine in a nationwide mass vaccination setting. *N. Engl. J. Med.* 2021 ;384 : 1412–1423.

Delanghe JR, Speeckaert MM, et De Buyzere ML. "ACE polymorphism is a determinant for COVID-19 mortality in the post-vaccination era" *ClinicChemistry and Labo Med (CCLM),*2022 ; 60.

Delanghe JR, Speeckaert MM, et De Buyzere ML. ACE polymorphism and COVID-19 outcome. *Endo.* 2020 ;70 :13-14.

Deng X, Garcia-Knight MA, Khalid MM, et al. Transmission, infectivity, and neutralization of a spike l452r sars-cov-2 variant. *Cell* ; 2021 ; 184 :3426–3437.

Dimassi S, Tilla M et Sanlaville D. Anomalies chromosomiques. *Journal de péd et de puériculture.* 2017; 30:249-270.

Dufour C, Casane D, Denton D, et al. Human-chimpanzee DNA sequence variation in the four major genes of the reninangio tensin system. *Genomics.*2000 ; 69 :14-2.

El Aroussi B. Infections fongiques et Covid-19. Thèse de doctorat en pharmacie. 2022. Université mohammed V de Rabat faculté de médecine et de pharmacie Rabat. 105p.

- Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, et al.** Genomics and epidemiology of the p.1 sars-cov-2 lineage in manaus, brazil. *Science* 2021 ;372 : 815–821.
- Frikh M, Benaissa M, Kasouati J, et al.** Prévalence de l'infertilité masculine dans un hôpital universitaire au Maroc [Prevalence of male infertility in a university hospital in Morocco]. *Pan Afr Med J.* 2021 ;38.
- Gautier V.** Les organes génitaux masculins. Larousse. 2017;1.
- Gunal O, Sezer O, Ustun GU, et al.** Angiotensin-converting enzyme-1 gene insertion/deletion polymorphism may be associated with COVID-19 clinical severity: a prospective cohort study. *Ann Saudi Med.* 2021 ;41 :141-146.
- Hatami N, Ahi S, Sadeghinikoo A, Foroughian M, et al.** Worldwide ACE (I/D) polymorphism may affect COVID-19 recovery rate: an ecological meta-regression. *Endocrine.* 2020 ;68 :479–484.
- He X, Hong W, Pan X, et al.** SARS-CoV-2 Omicron variant : Characteristics and prevention. *MedComm (2020).* 2021 ; 16 ;2 :838–45.
- Houston BJ, Riera-Escamilla A, Wyrwoll MJ, et al.** A systematic review of the validated monogenic causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene-disease relationships. *Hum Reprod Update.* 2021 ;28 :15-29.
- Hubacek JA, Dusek L, Majek O, et al.** ACE I/D polymorphism in Czech first-wave SARS-CoV-2-positive survivors. *Clin Chim Acta.* 2021 ;519 :206-209.
- Íñiguez M, Pérez-Matute P, Villoslada-Blanco P, et al.** ACE Gene Variants Rise the Risk of Severe COVID-19 in Patients With Hypertension, Dyslipidemia or Diabetes: A Spanish Pilot Study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 ; 19 ;12.
- Karia R, Gupta I, Kamdait H, et al.** Covid-19 and its modes of transmission. *Scicompr clin Med.* 2020 ; 2 : 1-4.
- Kazemijalish H, Ramezani T F, Behboudi-Gandevani S, et al.** The Prevalence and Causes of Primary Infertility in Iran : A Population-Based Study. *Global J of Health Sci.* 2015 ;7 :226.
- Kemp SA, Collier DA, Datir RP, et al.** SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection. *Nature.* 2021 ; 592 : 277–282.
- Klhůfek J.** The role of angiotensin-converting enzyme 2 in the pathogenesis of COVID-19 : the villain of the hero? *Acta Clin Belg.* 2022 ;77 :211-218.
- Laan M, Kasak L, Punab M.** Translational aspects of novel findings in genetics of male infertility-status quo. 2021. *Br Med Bull.* 2021 ;140 :5-22.

- Lawrence AM & Chandrasekar T.** Male Infertility and Prostate Ultrasound. *Prostate Ultrasound*. 2014 ;7 : 87–100.
- Lefebvre J.** Polymorphismes génétiques et variations interindividuelles de la réponse aux agents antihypertenseurs. Thèse de doctorat (PH. D). Université Laval Québec, Canada. Faculté de pharmacie. 2008 : 189p.
- Leslie SW, Siref LE, Soon-Sutton TL, et al.** Male Infertility. In : *Stat Pearls*. Stat Pearls Publishing, Treasure Island (FL) ; 2021. PMID : 32965929.
- Leung NH.** Transmissibility and transmission of respiratory Viruses. *Nat Revie Microbio*. 2021 ; 19 :528-545.
- Liao WX, Roy AC.** Lack of association between polymorphisms in the testis-specific angiotensin converting enzyme gene and male infertility in an Asian population. *Mol Hum Reprod*. 2002 ;8 :299-303.
- Lotti F et Maggi M.** Sexual dysfunction and male infertility. *Nat Revie Urology*. 2018 ; 20.
- Oud MS, Volozonoka L, Smits RM, et al.** A systematic review and standardized clinical validity assessment of male infertility genes. *Human Reproduction*. 2019 ;1;34(5):932-41.
- Matumo Ph, BundukiG, SolyKamwira I, et al.** Anomalies du spermogramme en consultations pré-nuptiales et dans les couples infertiles à Butembo, République Démocratique du Congo. *PAMJ*. 2020 ;37.
- Mayouf S, MseddiMA, Ben Amor S, et al.** 46 XX male syndrome with multerianosis of the urinary bladder: A new clinical entity. *Urology case Reports*. 2021;39.
- McArthur L, Sakthivel D, Ataide R, et al.** Review of Burden, Clinical Definitions, and Management of COVID-19 Cases. *Am J Trop Med Hyg*. 2020 ;103 :625-638.
- McKenzie CA, Julier C, Forrester T, et al.** Segregation and linkage analysis of serumangiotensin I-converting enzyme levels:evidence for two quantitative-trait loci. *Am J Hum Genet*. 1995 ; 57 : 1426-35.
- Mehri S, Boussaada R, Mahjoub S, et al.** Le polymorphisme du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et le risque de l'infarctus du myocarde en Tunisie. *Antropo*. 2005 ; 10 : 75-81.
- Moshrefi M, Ghasemi-Esmailabad S, Ali J, et al.** The probable destructive mechanisms behind COVID-19 on male reproduction system and fertility. *J Assist Reprod Genet*. 2021 ;38 :1691-1708.
- Nigel M.** Zinc metalloproteases in health and disease. Hoopered. Taylor and Francis Ltd.1996 ; 84-88/91-9.

- Olaniyan OT, Dare A, Adetunji O, et al.** Testis and blood-testis barrier in Covid-19 infestation : role of angiotensin-converting enzyme 2 in male infertility. *Jr of Basic and Clinic Physio and Pharmaco.* 2020 ; 14 : 156.
- Omolaoye T S, Adeniji A A, Maya W DC, et al.** SARS-COV-2 (Covid-19) and Male Fertility:where are we? *Reproductive Toxicology.* 2020 ; 99 : 65-70.
- Papadopoulou A, Fragkou PC, Maratou E, et al.** Angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism, ACE activity, and COVID-19 : A rather controversial hypothesis. A case-control study. *J Med Virol.* 2022 ;94 :1050-1059.
- Pascolo L, Zito G, Zupin L, et al.** ReninAngiotensin System, COVID-19 and Male Fertility:Any Risk for Conceiving? *Microorganisms.* 2020 ;8 :1492.
- Patel S, Rauf A, Khan H, et al.** Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS) : The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother.* 2017 ;94 :317-325.
- Rajak P, Roy S, Dutta M, et al.** Understanding the cross-talk between mediators of infertility and Covid-19. *Reprod Biol.* 2021 ; 21 :100-559.
- Raman R, Patel KJ, Ranjan K.** COVID-19 :UnmaskingEmerging SARS-CoV-2 Variants, Vaccines and TherapeuticStrategies. *Biomolecules.* 2021 ;11 :993.
- Rani DS, Rajender S, Pavani K, et al.** High frequencies of non-allelic homologous recombination (NAH1) events at the AZF loci and male infertility in Indian men. *Sci reports.* 2019; 9:1-11.
- Sabater Molina M, Nicolás Rocamora E, Bendicho AI, et al.** Polymorphisms in ACE, ACE2, AGTR1 genes and severity of COVID-19 disease. *PLoS One.* 2022 ;17.
- Sabour TM, Rahmani SA, BadrYadollah A, et al.** Cytogenetic andmicrodeletions of AZF regions of Ychromosome studies in infertile males in nouthwest of Iran. *Iran Journ of pub Health.* 2020; 49:1380-1381.
- Sengupta P, Leisegang K, Agarwal A.** The impact of COVID-19 on the male reproductive tract and fertility: A systematicreview. *Arab J Urol.* 2021 ;19 :423-436.
- Shen C, Yu N, Cai S, et al.** Evaluation of dynamiclung changes during coronavirus disease 2019 (COVID-19) by quantitative computedtomography. *J XraySciTechnol.* 2020 ;28 :863-873.
- Singh K, Jaiswal D.** Human male infertility :àcomplexmultifactorialphenotype. *ReprodSci.* 2011 ;18 :418-25.
- Sudhakar DVS, Shah R, Gajbhiye RK.** Genetics of Male Infertility - Present and Future : A Narrative Review. *J Hum ReprodSci.* 2021 ;14 :217-227.

Tang Q, Pan F, Wu X, et al. Semen quality and cigarette smoking in a cohort of healthy fertile men. *Environ Epidemiol.* 2019 ;3.

Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, et al. Detection of a SARS-COV-2 variant of concern in southafrica. *Nature* 2021, 592, 438–443.

Uzay E, Kizilay F, Altay B, et al. Invertigation of genotype- phenotype correlation in patients with AZF microdeletion in a single- reference centre. *Andrologia.* 2021;53.

Verma S, Abbas M, Verma S, et al. Impact of I/D polymorphism of angiotensin-converting enzyme 1 (ACE1) gene on the severity of COVID-19 patients. *Infect Genet Evol.* 2021 ;91 :104801.

Volz E, Mishra S, Chand M, et al. Assessing transmissibility of SARS-COV-2 lineage b.1.1.7 in england. *Nature* 2021 ;593 : 266–269.

Wang R, He J, Xi Q, et al. Association Between Polymorphisms in the Angiotensin-Converting Enzyme Gene and Non-Obstructive Azoospermia in the Chinese Han Population fromNortheast China. *Med SciMonit.* 2019 ;25 :4423-4429.

Yamamoto N, Nishida N, Yamamoto R, et al. Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) 1 Gene Polymorphism and Phenotypic Expression of COVID-19 Symptoms. *Genes (Basel).* 2021 ;12 :1572.

Yan R, Wu S, Wang W, et al. Genoration of a human induced pluripotent stem cell line (SMUSHI001-A) from a patient with 46, XX male sex reversal syndrome carrying the SRY gene. *Stem cell research.*2021;54.

Zhang W, Davis BD, Chen SS, et al. Emergence of a novel SARS-COV-2 variant in southern california. *JAMA* 2021 ; 325 : 1324–1326.

Annexes

Annexe 1 : Fiche de recueil d'informations/ témoin (homme)

Données générales	
NOM et prénom :	Tél :
Age:	
Poids: kg	La taille cm
Profession :	
Année de mariage :	
Avez-vous des enfants ?	Si, oui ? combien le nombre ?
Avez-vous eu le COVID ?	Lequel ?
Type de covid-19	
Avez-vous fait le vaccin contre la Covid-19 ?	Oui / NON
Avez-vous une autre maladie	Laquelle ?
Pratiquez-vous du sport ?	Oui / non
Etes-vous fumeur ?	Oui / non
Stress	Oui / non

Annexe 2 : fiche de recueil d'informations/ patient (homme)

Données générales	
Nom et prénom du patient :....	Tél :
Age du patient :	
Poids du patient : kg	Taille :
Profession :	
Type d'infertilité primaire ou secondaire ?	
Durée d'infertilité	
Avez-vous eu le COVID :	
Type de COVID :	
Avez-vous fait le vaccin contre la covid-19	
Avez-vous une autre maladie :	Laquelle
Pratiquez-vous du sport ?	Oui / non
Etes-vous fumeur ?	Oui / non
Stress :	Oui / non

Résultat du spermogramme

La viscosité	Le volume
Le pH	La numération des spermatozoïdes
La présence des cellules germinales	Le taux de globules blancs
Les agglutinats	% de spermatozoïdes vivants
La mobilité	
Résultat du spermocytogramme ?	
Le pourcentage des formes atypiques	
La morphologie des spermatozoïdes	
Recherche des anticorps anti-spermatozoïdes ?	Oui / non
Examens complémentaires	
Bilan hormonal	

Annexe 3 : Préparation des solutions d'extraction de l'ADN

-TE 20 : 5 : (tris 20 Mm, EDTA 5 Mm, PH 7.5) auto clavé

Tris : 2,422 g

EDTA : 1,86 g qsp 1 L

-TE 10 : 1 : (tris 10Mm, EDTA 1 Mm, PH 7.4) auto clavé

Tris : 0,606g

EDTA : 0,1869g qsp 500ml.

-Tampon de lyse :

NaCl 400 Mm NaCl= 23,36g

Tris : 10Mm Tris= 1,21g

EDTA : 2Mm EDTA= 0,72g

PH 8.2 qsp 1 L

Résumés

Résumé

L'infertilité masculine est une maladie complexe, multifactorielle et un véritable problème de santé publique. Des anomalies génétiques sont couramment observées chez les hommes infertiles, bien que la majorité des cas restent idiopathiques. Ces dernières années, la relation entre les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) et l'infertilité masculine a fait l'objet d'une attention croissante.

Objectifs : la présente étude visait à déterminer l'implication de certains facteurs de risque (Tabac, COVID 19) chez les hommes des couples infertiles à Constantine. Nous avons également essayé de résumer la compréhension actuelle des mécanismes probables et des allégations d'effets néfastes du SARS-CoV-2 sur le potentiel de la fertilité masculine d'une part, et d'autre part explorer la relation entre l'infertilité masculine et le polymorphisme ID du gène de l'ECA.

Patients et méthodes : c'est une étude descriptive transversale de type cas-témoins effectuée au Centre de PMA Ibn Rochd. La population d'étude était constituée de 21 sujets masculins dont 11 sujets infertiles et 10 fertiles. Après extraction de l'ADN par la méthode au NaCl, le génotypage du polymorphisme étudié a été fait par une PCR.

Résultats : selon nos résultats, le tabac ne représente pas un facteur de risque pour l'infertilité masculine dans notre population d'étude. L'effet de COVID 19 sur les paramètres spermatiques des hommes fertiles et infertiles n'a pas pu être évalué à cause de la taille de l'échantillon très réduite ainsi que le manque d'informations pour la plupart des sujets recrutés. Selon les données de la littérature, la COVID-19 semble impacter négativement la fertilité masculine, de manière transitoire, mais significative. Les résultats de comparaison des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme ID du gène *ECA* n'ont montré aucune différence significative entre les groupes étudiés.

Conclusion : le tabac, le polymorphisme ID du gène *ECA* ne peuvent être considérés comme facteurs de risque pour l'infertilité masculine dans la population étudiée. Ces résultats doivent être vérifiés sur un échantillon plus important.

Mots clés : infertilité masculine, COVID 19, Gène *ECA*, PCR.

Abstract

Male infertility is a complex, multifactorial disease and a real public health problem. Genetic abnormalities are commonly observed in infertile men, although the majority of cases remain idiopathic. In recent years, the relationship between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and male infertility has received increasing attention.

Objectives: The present study aimed to determine the involvement of some risk factors (Tobacco, COVID 19) in men of infertile couples in Constantine. We also tried to summarize the current understanding of the likely mechanisms and claims of adverse effects of SARS-CoV-2 on male fertility potential on the one hand, and on the other hand to explore the relationship between male infertility and the ACE gene ID polymorphism.

Patients and methods: This is a descriptive cross-sectional case-control study conducted at the Ibn Rochd MAP Center. The study population consisted of 21 male subjects of which 11 were infertile and 10 fertile. After extraction of DNA by the NaCl method, genotyping of the studied polymorphism was done by PCR.

Results: According to our results, smoking is not a risk factor for male infertility in our study population. The effect of COVID 19 on the sperm parameters of fertile and infertile men could not be evaluated because of the very small sample size and the lack of information for most of the recruited subjects. According to the literature, COVID-19 appears to have a transient but significant negative impact on male fertility. The results of the comparison of genotypic and allelic frequencies of the ACE gene ID polymorphism showed no significant difference between the groups studied.

Conclusion: Smoking and the ACE gene ID polymorphism cannot be considered as risk factors for male infertility in the study population. These results must be verified on a larger sample.

Key words: male infertility, COVID 19, ACE gene, PCR.

ملخص

العقم عند الرجال مرض معقد متعدد العوامل ومشكلة صحية عامة حقيقية . تشهد التشوهات الجينية بشكل شائع عند الرجال المصابين بالعقم ، على الرغم من أن غالبية الحالات تظل مجهولة السبب . في السنوات الأخيرة ، حظيت العالقة بين تعدد (SNPs) أشكال النوكليوتيدات المفردة وعقم الذكور باهتمام متزايد

الأهداف : هدفت الدراسة الحالية إلى تحديد تورط بعض عوامل الخطر (التبغ ، COVID 19) في الرجال من الأزواج المصابين بالعقم في قسنطينة . لقد حاولنا أيضا تلخيص الفهم الحالي لآليات والمزاعم المحتملة للتأثيرات الضارة ل SARS-CoV-2 على احتمالية خصوبة الذكور من ناحية ، ومن ناحية أخرى الستكشاف العالقة بين العقم عند الذكور و

تعدد الأشكال لجين ECA

المرضى والطرق : هذه دراسة وصفية مقطعية أجريت في مركز ابن رشد . AMP يتألف مجتمع الدراسة من 21 ذكورًا بما في ذلك 11 مصاباً بالعقم و 10 شواهد . بعد استخالص الحمض النووي بطريقة كلوريد الصوديوم ، تم إجراء التنميط الجيني لتعدد الأشكال المدروس بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل .

النتائج : وفق أ لنتائجنا، ال يمثل التبغ عامل خطر لعقم الذكور في مجتمع دراستنا . ال يمكن تقييم تأثير 19 DIVOC على معايير الحيوانات المنوية للرجال الذين يعانون من الخصوبة والعقم بسبب حجم العينة الصغير جدا ونقص المعلومات لمعظم الأشخاص المعينين . وفق أ لبيانات من الأديبات، يبدو أن 19-DIVOC له تأثير سلبي عابر ولكنه مهم على خصوبة الذكور . لم تظهر نتائج مقارنة الترددات الوراثية والترددات الأليلية لتعدد الأشكال ID لجين ECA أي فرق معنوي بين المجموعات المدروسة .

الخالصة : ال يمكن اعتبار التبغ ، تعدد الأشكال المعرف لجين الإنزيم المحول لأنجيوتنسين من عوامل الخطر لعقم الذكور في المجموعة السكانية المدروسة . يجب التحقق من هذه النتائج على عينة أكبر الكلمات المفتاحية : العقم عند الذكور ، كوفيد 19 ، جين ECAD ،

Année universitaire : 2021-2022	Présenté par : DAOUD Wahida KEBAILI Kaouther KHALED Anis
Covid 19, infertilité masculine et polymorphisme de l'ECA	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique	
<p>L'infertilité masculine est une maladie complexe, multifactorielle et un véritable problème de santé publique. Des anomalies génétiques sont couramment observées chez les hommes infertiles, bien que la majorité des cas restent idiopathiques. Ces dernières années, la relation entre les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) et l'infertilité masculine a fait l'objet d'une attention croissante.</p> <p>Objectifs : la présente étude visait à déterminer l'implication de certains facteurs de risque (Tabac, COVID 19) chez les hommes des couples infertiles à Constantine. Nous avons également essayé de résumer la compréhension actuelle des mécanismes probables et des allégations d'effets néfastes du SARS-CoV-2 sur le potentiel de la fertilité masculine d'une part, et d'autre part explorer la relation entre l'infertilité masculine et le polymorphisme ID du gène de l'ECA.</p> <p>Patients et méthodes : c'est une étude descriptive transversale de type cas-témoins effectuée au Centre de PMA Ibn Rochd. La population d'étude était constituée de 21 sujets masculins dont 11 sujets infertiles et 10 fertiles. Après extraction de l'ADN par la méthode au NaCl, le génotypage du polymorphisme étudié a été fait par une PCR.</p> <p>Résultats : selon nos résultats, le tabac ne représente pas un facteur de risque pour l'infertilité masculine dans notre population d'étude. L'effet de COVID 19 sur les paramètres spermatiques des hommes fertiles et infertiles n'a pas pu être évalué à cause de la taille de l'échantillon très réduite ainsi que le manque d'informations pour la plupart des sujets recrutés. Selon les données de la littérature, la COVID-19 semble impacter négativement la fertilité masculine, de manière transitoire, mais significative. Les résultats de comparaison des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme ID du gène <i>ECA</i> n'ont montré aucune différence significative entre les groupes étudiés ($p > 0,05$).</p> <p>Conclusion : le tabac, le polymorphisme ID du gène <i>ECA</i> ne peuvent être considérés comme facteurs de risque pour l'infertilité masculine dans la population étudiée. Ces résultats doivent être vérifiés sur un échantillon plus important.</p>	
Mots clés : infertilité masculine, COVID 19, Gène <i>ECA</i> , PCR.	
<p>Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie Moléculaire, Université Frère Mentouri, Constantine 1. Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, Université Mentouri, Constantine 1.</p>	
<p>Encadrant : CHELLAT-REZGOUN Djalila (Professeur – UPMC1) Examineur 1 : SATTAL Dalila (Professeur – UPMC1) Examineur 2 : REZGOUN M^{ed} Larbi (Maître de conférences A – UPMC1)</p>	