



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biologie Animale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
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

Intitulé :

Étude moléculaire du gène *TEX11* dans les infertilités masculines idiopathiques (Azoospermie) dans un échantillon de patients de l'est algérien

Présenté et soutenu par : Djeghim Malak
Terki Maïssa

Le : 20/06/2023

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : BENHIZIA Hayet (MCA. Université Frères Mentouri Constantine 1).

Rapporteurs : BECHKRI Sakina (MCA. Université Frères Mentouri Constantine 1).

NINI Anissa (**Ingénieur principale** .Centre de Recherche en Biotechnologies).

Examinatrice : BOUDOKHANE Ibtissem (MCB. Université Frères Mentouri Constantine 1).

Année universitaire
2022-2023

Remerciements

Nous remercions tout d'abord **ALLAH** le tout puissant, pour nous avoir donné la force, la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nous voudrions bien exprimer notre très profonde reconnaissance et nos sentiments les plus sincères à **M^{me} NINI Anissa** (ingénieur au Centre de Recherche en Biotechnologie Constantine) pour son accueil chaleureux, sa qualité d'encadrement exceptionnel, ses orientations et conseils, ses encouragements, sa patience, sa gentillesse, et sa bonne humeur ; aussi bien pour sa disponibilité et la mise à disposition du matériel nécessaire pour la réalisation de ce travail, en veillant au bon déroulement de nos expériences.

Veillez bien trouver ici l'expression de notre vive gratitude et notre profond respect.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à notre encadrant **Dr. BECHKRI** pour son encadrement exemplaire .Ce travail n'aurait pas été aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans votre aide et votre grande confiance, merci de nous avoir donné une si belle chance pour faire notre étude au niveau du centre de recherche en biotechnologie.

Nous vous prions de bien vouloir trouver ici le témoignage, de notre haute considération et nos sincères remerciements.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements à notre présidente de jury **Dr.BENHIZIA** qui nous a fait l'honneur de présider ce jury et de participer à l'évaluation de ce travail.

Un remerciement spécial à **Dr.BOUDOKHANE** d'avoir accepté d'examiner ce modeste document et de juger ce travail. Votre présence est un honneur .

Nos vifs remerciements et notre profond respect s'adressent à :

- Tous nos **enseignants** (Licence et Master) de la spécialité Génétique pour avoir partagé avec nous leurs hautes compétences scientifiques.
- À tous les membres du **Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine**.
- Et à toute personne ayant participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

Avant toute chose, je remercie **ALLAH**, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

Je dédie ce mémoire:

Aux prunelles de mes yeux mon très cher père et ma très chère maman

Pour tous les efforts et les sacrifices consentis, les valeurs nobles, les précieux conseils que vous m'avez prodigués, l'amour, la tendresse, le soutien inlassable, et vos prières tout au long de mes études et depuis ma naissance ; aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez, et aucun mot ne pourrait exprimer à sa juste valeur la gratitude et l'amour éternel envers vous.

Puisse Allah, vous préserver et vous accorder santé, bonheur et longue vie.

À mon très cher frère Khaled et ma très chère adorable sœur Nousseiba

Pour le soutien, l'amour, l'appui et les encouragements permanents, je vous offre toute ma gratitude, mon amour et mon attachement le plus profond. Qu'Allah nous garde tous unis. **À ma douce Falek**, ma sœur que ma mère n'a pas enfantée, les mots sont insuffisants pour exprimer ma gratitude, mon amour et ma profonde estime Qu'Allah te protège et te garde.

À mes chers anges Kossay, Baraa et Ritel

Symbole de l'innocence ; ma source de sourire et jovialité, modulateurs de mon humeur et boosters de mon bon moral, je vous aime infiniment mes amours.

À ma très chère grand-mère maternelle

Vous m'avez accompagné toujours par vos prières, puisse Allah vous préserver et vous accorder santé, bonheur et longue vie.

À la mémoire de mon très cher grand-père maternel Rabeh

J'aurais aimé que vous soyez présent ; vous avez laissé un énorme vide, vous n'êtes plus là où vous étiez, mais vous êtes partout là où je suis, et dans mon cœur.

Qu'Allah vous accorde sa miséricorde et vous accueille en son vaste paradis.

À mes très chers oncles, tantes maternels et leurs enfants

Pour l'amour, le soutien, les efforts, les conseils et les encouragements permanents ;

Merci d'être toujours là pour moi. Je vous aime infiniment.

À la mémoire de mon grand père et ma grand-mère paternels

Qu'Allah leur accorde sa miséricorde et les accueille en son vaste paradis

À ma partenaire Malak

Pour ta patience et ton dévouement dans ce travail, je te dédie le fruit de nos efforts et je te remercie pour les moments que nous avons vécu ensemble et les souvenirs inoubliables.

Je te souhaite une vie pleine de santé, de bonheur et de réussite.

À mon amie intime Israa

Je n'ai pas trouvé les mots justes et sincères pour t'exprimer mon affection; tu es une sœur que ma mère n'a pas enfantée, une amie sur qui je peux compter, et un symbole de la vraie amitié. Qu'Allah te garde et t'accorde santé, bonheur et longue vie.

À celui qui a cru en moi et a été à mes côtés, qu'Allah vous garde et vous bénisse.

À toute ma grande famille, à mes amies pour tout ce que nous avons partagé ensemble.

À tous ceux qui me sont chers et à toutes les personnes proches que je n'ai pas citées.

Dédicaces

Grâce à l'aide de DIEU tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai Pu, Réaliser ce travail que je dédie :

- À la femme la plus chère du monde, ma très chère mère «**Naziha** », la source de tendresse qui a tout donné sans rien recevoir, je ne pourrais exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous.
- À mon très cher père « **Ahmed** » Pour vos encouragements durant mes nombreuses années d'études et votre confiance. J'espère que vous en tirez un sentiment de fierté.
- En signe de l'affection et du grand amour que je vous porte. À mes chères et adorables sœurs qui comptent beaucoup pour moi et sur qui je suis certaine de toujours pouvoir m'appuyer « **Sara, Soumia, Ahlem, Anfel** ».
- À mes chers frères «**M^{ed}Anis, Adem** » Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé, et de réussite.
 - À mes anges « **Alaa, Wail, Afnan, Mouaad, Sadjed** » qui comptent beaucoup pour moi.
- À mes meilleures amies « **Haoua, Lydia, Insaf, Amira** » vous êtes les plus chères à mon cœur, vous êtes pour moi des sœurs sur qui je peux compter.
- À mes chères amies de l'université « **Maïssa, Chaima, Zahra, Yousra, Doria, Rayen, Hadjer** » Votre connaissance est un trésor pour moi.
 - À tous les membres de ma famille **maternelle** et **paternelle**.
- Je conclurai en remerciant de tout mon cœur **toutes mes amies et les gens que je connais** et qui m'ont soutenue ces dernières années, mais qui sont trop nombreux pour les citer tous ici...
- Et enfin À **moi-même**, je mérite un peu de reconnaissance.

MALAK ♥

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités

I- L'appareil génital masculin.....	4
I-1- Les testicules et l'épididyme.....	4
I-2- Les tubules séminifères.....	5
I-2-1- Cellules de sertoli	5
I-2-2- Cellules germinales	6
II- La spermatogenèse	6
II-1- Définition	6
II-2- Les étapes de la spermatogenèse.....	6
II-2-1- La phase de multiplication (mitose)	6
II-2-2- La phase de maturation.....	6
II-2-3- La phase de différenciation (La spermiogénèse).....	7
III- Les défauts de spermatogénèse.....	8
IV- La structure générale du spermatozoïde	8
IV-1- Le sperme	9

Chapitre II : L'infertilité masculine

I- Définition de l'infertilité	10
II- Épidémiologie.....	10
III- L'azoospermie	10
III-1- Définition	10
III-2- Azoospermie obstructive (AO)	11
III-3- Azoospermie non-obstructive (ANO).....	11
IV- Etiologie de l'infertilité masculine	12
IV-1- Facteurs génétiques	12
IV-1-1- Chromosomes sexuels.....	13
IV-1-2- Anomalies de nombre	14
IV-1-3- Anomalies de structure.....	15
IV-1-4- Mutation du gène <i>TEX11</i>	17

V-	Diagnostic de l'infertilité masculine.....	17
V-1-	Spermogramme.....	17
V-2-	Le Caryotype.....	18
V-3-	La polymérase chain réaction (PCR).....	19

Chapitre III : Le gène *TEX11*

I-	Présentation.....	20
II-	Identification et localisation du gène <i>TEX 11</i>	20
III-	Structure.....	21
IV-	Le rôle du gène <i>TEX11</i>	22
V-	Les mutations.....	22

Deuxième partie : Patients et méthodes

I-	Lieu et durée de l'étude.....	25
II-	Recrutement des patients infertiles.....	25
II-1-	Patients.....	25
II-2-	Critères d'exclusion.....	25
II-3-	Critères d'inclusion.....	25
III-	Méthodologie.....	25
III-1-	Extraction d'ADN à partir de sang total par salting out.....	25
III-2-	Génotypage.....	25
III-2-1-	Amplification de la région d'intérêt.....	26
III-2-2-	Polymérase chain réaction (PCR).....	26
III-2-3-	Contrôle des produits de la PCR.....	27
III-2-4-	Digestion des produits PCR.....	28

Troisième partie : Résultats et discussion

I-	Caractéristiques principales des patients.....	30
II-	Résultats.....	30
II-1-	Caryotype.....	30
II-2-	PCR.....	30
II-3-	PCR/ Digestion enzymatique.....	31

	Conclusion et perspectives.....	35
--	--	-----------

	Références bibliographiques.....	38
--	---	-----------

Annexes

Résumés

Liste des abréviations

μl : Microlitre

μm : Micromètre

2n : Diploïde

ADNc : Acide Désoxy-ribo-Nucléique complémentaire

ANO : Azoospermie non obstructive

AO : Azoospermie obstructive

AZF : Azoospermia Factor / Facteur d'Azoospermie

AZF a : Azoospermia Factor a / Facteur d'Azoospermie a

AZF b : Azoospermia Factor b / Facteur d'Azoospermie b

AZF c : Azoospermia Factor c / Facteur d'Azoospermie c

BBP : Bleu Bromophénol

CSG : Cellules Souches germinales

dATP : DésoxyAdénosine-TriPhosphates

dCTP : DésoxyCytidine-TriPhosphates

dGTP : DésoxyGuanosine-TriPhosphates

dNTP : DésoxyNucléosides-TriPhosphates

dTTP : DésoxyThymidine-TriPhosphate

KB : Kilobase

kDa : Kilodalton

MI : Mitose

MLPA : Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

n : Haploïde

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NlaIII : *Neisseria lactamica III*

OMS : Organisation mondiale de la santé

Pb : Paire de base

PC : Pièce connective

PCR : Polymerase chain reaction

pH : Potentiel Hydrogène

PI : Pièce intermédiaire

PP : Pièce principale

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SK : Syndrome de Klinefelter

SNP : single nucleotide polymorphism / polymorphisme d'un seul nucléotide

TBE : Tris Borate EDTA

TEX 11 : Testis Expressed 11

TPR : Translocated promoter regions / Région promotrice transloquée

UV: Ultraviolets

Xp : Bras court du chromosome X

Xq : Bras long du chromosome X

Yq : Bras long du chromosome Y

Liste des figures

Figure 1 : Présentation schématique de l'appareil reproducteur masculin.....	4
Figure 2 : Structure interne du testicule et coupe transversale de portion des tubules séminifères.....	5
Figure 3 : Différentes étapes de la spermatogenèse	7
Figure 4 : Structure du spermatozoïde.....	8
Figure 5 : Représentation schématique des différents types d'azoospermie et de leurs principaux mécanismes	11
Figure 6 : Schéma de la structure globale du chromosome Y.....	13
Figure 7 : Structure du chromosome X et ses différentes régions.....	14
Figure 8 : Caryotype du syndrome de Klinefelter 47, XXY.	15
Figure 9 : Schéma du chromosome Y et effets des délétions d'AZFa, AZFb et AZFc	16
Figure 10 : Caryotype masculin normal en bandes R	19
Figure 11 : Structure du gène <i>TEX11</i> et organisation de la protéine avec toutes les nsSNP repérées cartographiées dans les domaines fonctionnels.....	21
Figure 12 : Modèle 3D de la protéine <i>TEX11</i> avec l'organisation des domaines et motifs.	21
Figure 13 : Représentation schématique du site de restriction de l'enzyme NlaIII.....	28
Figure 14 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus après digestion du produit de PCR du gène <i>TEX 11</i> par NlaIII.	28
Figure 15 : caryotype d'un homme atteint d'azoospermie non obstructive	30
Figure 16 : Électrophorèse sur gel d'agarose du produit PCR du gène <i>TEX11</i> (les résultats ne sont pas visibles en raison du haut poids moléculaire de l'ADN).	31
Figure 17 : Électrophorèse sur gel d'agarose, montrant le schéma d'amplification du polymorphisme du gène <i>TEX11</i>	31
Figure 18 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus après digestion du produit de PCR du gène <i>TEX11</i> par NlaIII	32

Liste des tableaux

Tableau I : Récapitulatif des paramètres du spermogramme défini par l’OMS	18
Tableau II: Variantes des gènes <i>TEX</i> identifiées uniquement chez les hommes atteints d'azoospermie et/ou d'infertilité.....	23
Tableau III : Séquences des amorces utilisées pour l’amplification de la région d’intérêt.	26

Introduction

Introduction

Longtemps, l'incapacité à concevoir était exclusivement liée aux femmes, probablement pour des raisons culturelles, et les traitements proposés étaient généralement destinés à corriger les problèmes de santé féminine. Cependant, avec l'avancement de la science et l'ouverture de la société, il est devenu clair que l'infertilité des hommes y est également responsable dans 20 à 30% des cas (**Agrawal et al., 2015**).

L'infertilité demeure un problème mondial qui touche environ 13 à 15% des couples en âge de procréer, tandis qu'un couple sur cinq n'arrive pas à concevoir durant la première année (**Leslie et al., 2022**).

Cependant, le taux d'infertilité est beaucoup plus élevé dans certaines régions mondiales atteignant jusqu'à 30% dans certaines populations, notamment en Asie du Sud, en Afrique subsaharienne, au Moyen-Orient et en Afrique du Nord, en Europe centrale et orientale et en Asie centrale (**Inhorn et Patrizio, 2015**).

La qualité du sperme est un élément déterminant important de l'infertilité masculine (**Amini et al., 2020**). Cette dernière est souvent liée à un déficit de quantité, de mobilité, de la morphologie ou du fonctionnement des spermatozoïdes, Ces altérations peuvent être identifiées à la suite d'une série d'examens (examen clinique, spermogramme...), mais les causes demeurent multiples ; telles que la varicocèle, les causes hormonales, infectieuses, génétiques, troubles de l'éjaculation ou de l'érection, comme elles peuvent être inexplicables (**Pelzman et Hwang ,2021**). Les facteurs environnementaux peuvent également altérer la qualité spermatique, tels que l'alcool, le tabac, le surpoids, la pollution et le stress (**Jurewicz et al., 2009**).

L'absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat est appelée azoospermie et son incidence est d'environ 10-15%. Cependant, parmi ces patients infertiles, 15-20% sont atteints d'azoospermie obstructive et 80-85% sont atteints d'azoospermie non obstructive (ANO). Cette dernière est définie par l'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat sans l'obstruction de la voie du tractus reproducteur, l'ANO est considérée comme l'une des maladies les plus difficiles à traiter dans l'infertilité masculine (**Yu et al., 2021**).

L'anomalie chromosomique la plus fréquente causant l'ANO est le syndrome de Klinefelter caractérisé par la présence d'un chromosome X supplémentaire, sa fréquence de 10-12% chez les patients atteints, le place en deuxième position après les causes inconnues, suivi par les microdélétions du bras long du chromosome Y (Yq) avec une fréquence de 7%, en supprimant le facteur azoospermique (AZF), et de 1% pour les

mutations touchants le gène *TEX11* (Cioppi *et al.* , 2021). Les mutations de ce gène sont diverses et présentent différentes formes, ce qui rend leur identification intéressante pour déterminer les causes de l'infertilité masculine (Sha *et al.*, 2018).

Les facteurs génétiques contribuent à 21-29% de l'azoospermie (Arafat *et al.*, 2017). Quand l'origine du défaut de la spermatogenèse ne peut pas être reconnue, on parle d'infertilité « idiopathique ».

Notre travail de recherche s'inscrit dans ce contexte. Il a pour objectifs de :

- Réaliser une étude bibliographique approfondie sur l'infertilité masculine, ses causes génétiques et sa relation avec le chromosome X et les mutations du gène *TEX11*, en actualisant les données de la littérature.
- Réaliser une étude moléculaire du polymorphisme du gène *TEX11* de l'exon 7 chez des patients d'origine algérienne atteints d'ANO et n'ayant pas de microdélétions du chromosome Y.

Le présent mémoire est structuré comme suit :

- Une revue de la littérature.
- Une partie pratique comprenant résultats et discussion.
- Une conclusion vient clôturer ce présent mémoire.

Première partie :
Synthèse
Bibliographique

Premier chapitre : Généralités

I- L'appareil génital masculin

L'appareil génital masculin désigne tous les organes et les structures qui participent à la production des gamètes mâles ou spermatozoïdes, leur transport, nutrition, stockage dans les voies génitales masculines et leur expulsion dans les voies génitales féminines (Barone, 2001).

Il est composé de deux testicules, des voies spermatiques excrétrices (épididymes, canaux déférents et urètres), des glandes annexes (vésicules séminales, prostate et glandes de Cowper) et du pénis (Kherraf, 2016).

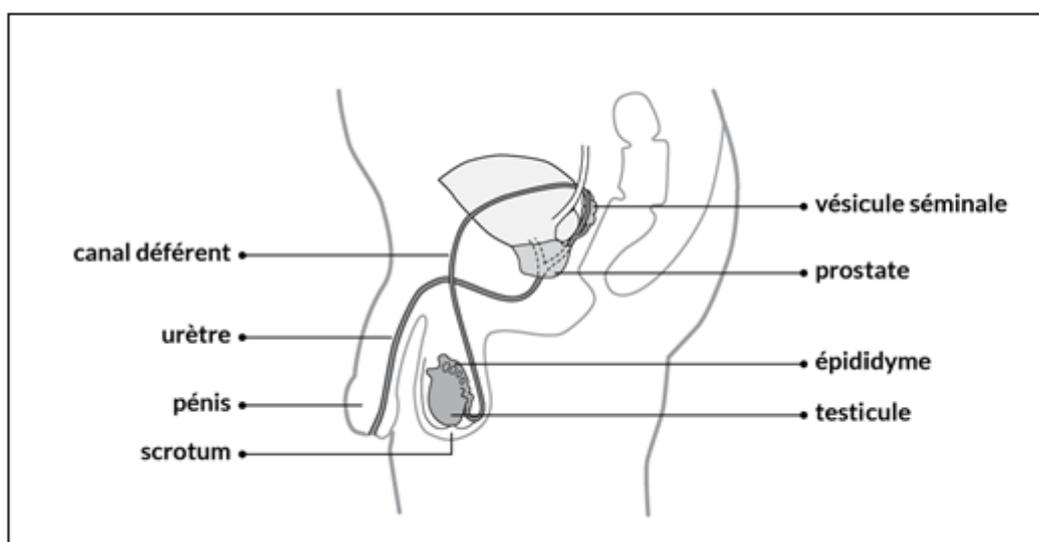


Figure 1: Présentation schématique de l'appareil reproducteur masculin (Anonyme 1)

I-1- Les testicules et l'épididyme

Les testicules sont deux organes symétriques de forme ovoïde logés dans le scrotum et entourés par une enveloppe rigide nommée l'albuginée ou *tunica albuginea* (Kherraf, 2016). Au pôle supérieur du testicule, on trouve l'épididyme qui est une formation allongée posée sur le testicule. Elle est solidaire du testicule au niveau des tubes droits et comprend trois parties : la tête de l'épididyme de forme arrondie au contact du bord supérieur de la gonade (5 à 12 mm diamètre), le corps de l'épididyme qui va en s'effilant, et la partie la plus étroite la queue de l'épididyme qui se prolonge par le conduit déférent (Boudghène et Tassart, 2014).

L'épididyme est impliqué dans le transport et la maturation des spermatozoïdes ainsi que, dans sa partie terminale (queue ou cauda), dans le stockage des spermatozoïdes entre deux éjaculations (Noblanc *et al.*, 2012).

Le parenchyme testiculaire est divisé en 200-300 lobules séparés par des invaginations de la *tunica albuginea*. La partie supérieure de cette tunique présente un épaissement triangulaire (corps de Highmore) qui contient les canaux du rete testis. C'est au niveau de cette dernière structure que convergent l'ensemble des tubules séminifères du parenchyme (Kherraf, 2016).

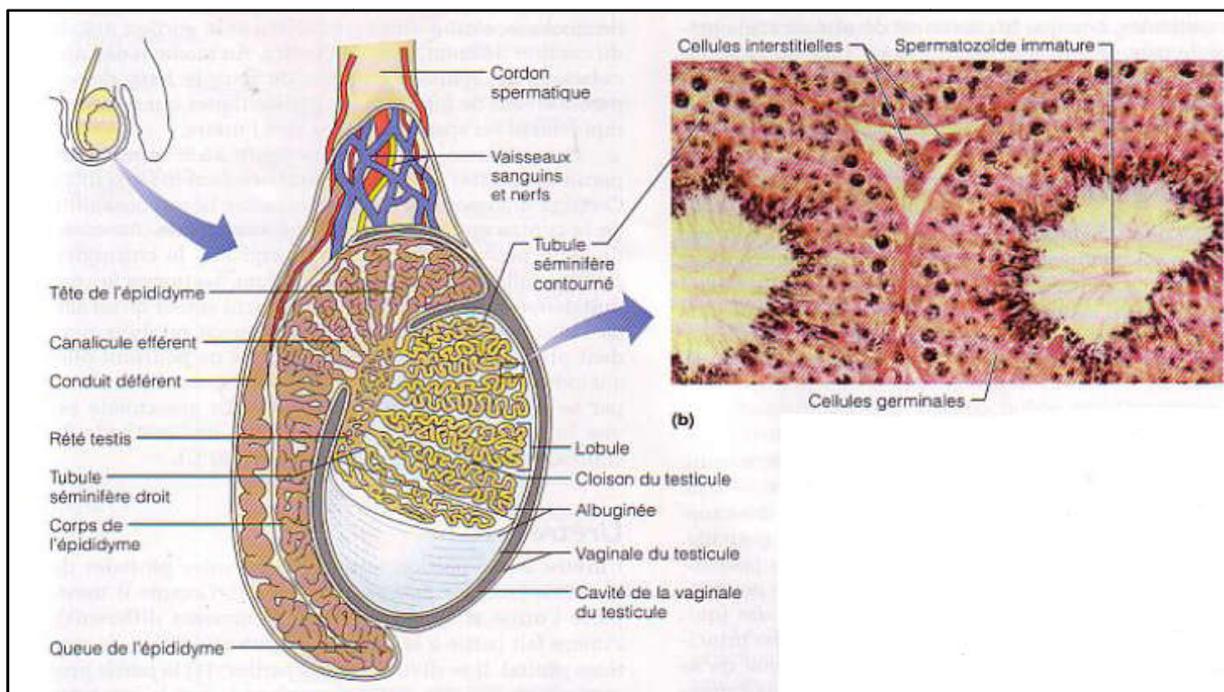


Figure 2 : Structure interne du testicule et coupe transversale de portion des tubules séminifères (Marieb, 1999).

I-2- Les tubules séminifères

Les tubules séminifères sont les unités de base des testicules où se déroule la spermatogenèse. Ils représentent environ 60% du volume testiculaire total et ils sont composé de l'épithélium germinale et de tissu péritybulaire (Wu, 2022).

L'épithélium germinale est constitué de :

I-2-1- Cellules de sertoli

Il s'agit d'une cellule grossièrement pyramidale, c'est la seule cellule somatique présente dans les tubules séminifères. Elle a un rôle dans la spermatogenèse en permettant la progression des cellules germinales en spermatozoïdes par un contact étroit dans les tubules séminifères. Sans le soutien physique et métabolique des cellules de Sertoli la différenciation des cellules germinales, leur entrée en méiose et leur transformation en spermatozoïdes ne peuvent se faire (Ravel et Jaillard, 2011).

I-2-2- Cellules germinales

Les cellules germinales sont les seules cellules de l'organisme capables d'entamer le processus de méiose. Elles permettent de véhiculer l'information génétique et épigénétique aux nouvelles générations. Elles sont disposées au sein de l'épithélium séminifère de manière très organisée (**Kherraf, 2016**).

II- La spermatogenèse

II-1- Définition

La spermatogenèse est un processus continu de différenciation cellulaire qui aboutit à la production chez l'adulte des spermatozoïdes (haploïdes) au cours de la vie reproductive de l'individu. Elle se déroule à l'intérieur des tubes séminifères du testicule, ce processus se développe à partir d'un nombre restreint de cellules, les cellules souches germinales (CSG) diploïdes nommées les spermatogonies (**Barraud-Lange et al., 2018**).

La spermatogenèse se déroule physiologiquement à une température de 32 à 35 °C, au cours d'un cycle spermatogénétique de 74 jours (**Schlosser et al., 2007**).

On estime que chaque testicule produit environ 45 millions de spermatozoïdes par jour soit près de 1000 spermatozoïdes par seconde (**Griswold, 2016**).

II-2- Les étapes de la spermatogenèse

La spermatogenèse se divise en trois étapes distinctes :

II-2-1- La phase de multiplication (mitose)

La division des cellules germinales débute avec la prolifération par mitose des spermatogonies (2n), situées en périphérie des tubes séminifères sur la membrane basale. Elle donne des spermatocytes I (2n) (**Sigala, 2016**).

II-2-2- La phase de maturation

C'est le seul processus cellulaire qui permet de passer d'une cellule diploïde (2n) à quatre cellules haploïdes (n). Elle est constituée d'une succession de deux divisions cellulaires (**Van eecke, 2019**).

a- Les spermatocytes primaires et la méiose I

La première division méiotique (MI) est une division réductionnelle : elle passe du stade prophase I longue, à la métaphase I, puis l'anaphase I et aboutit à la télophase I. C'est lors de la prophase I qu'a lieu le brassage génétique (par crossing over) assurant la diversité génétique. De cette façon les spermatocytes I (2n chromosomes, 2 chromatides) donnent des spermatocytes II : n chromosomes, deux chromatides (**Van eecke, 2019**).

b- Les spermatocytes secondaires et la méiose II

Ces spermatocytes II subissent la seconde division méiotique (MII) ou division équationnelle où les chromatides sœurs se séparent pour donner deux cellules filles qui forment les spermatides n chromosome, une chromatide (**Van ecke, 2019**).

II-2-3- La phase de différenciation (La spermiogénèse)

Ce processus long et très spécialisé se déroule près de la lumière des tubes séminifères et dure environ 23 jours. C'est une étape où les spermatides rondes immatures se différencient en spermatozoïdes en subissant plusieurs modifications et changements morphologiques (**Van ecke, 2019**).

Les transformations de la spermatide qui se déroulent durant la spermiogénèse sont :

- La condensation du noyau
- La formation de l'acrosome
- La formation de flagelle
- La formation de manchon mitochondrial
- L'élimination des restes cytoplasmiques
- Les modifications membranaires
- La synthèse des protéines cytoplasmique (**Brugnon, 2009**).

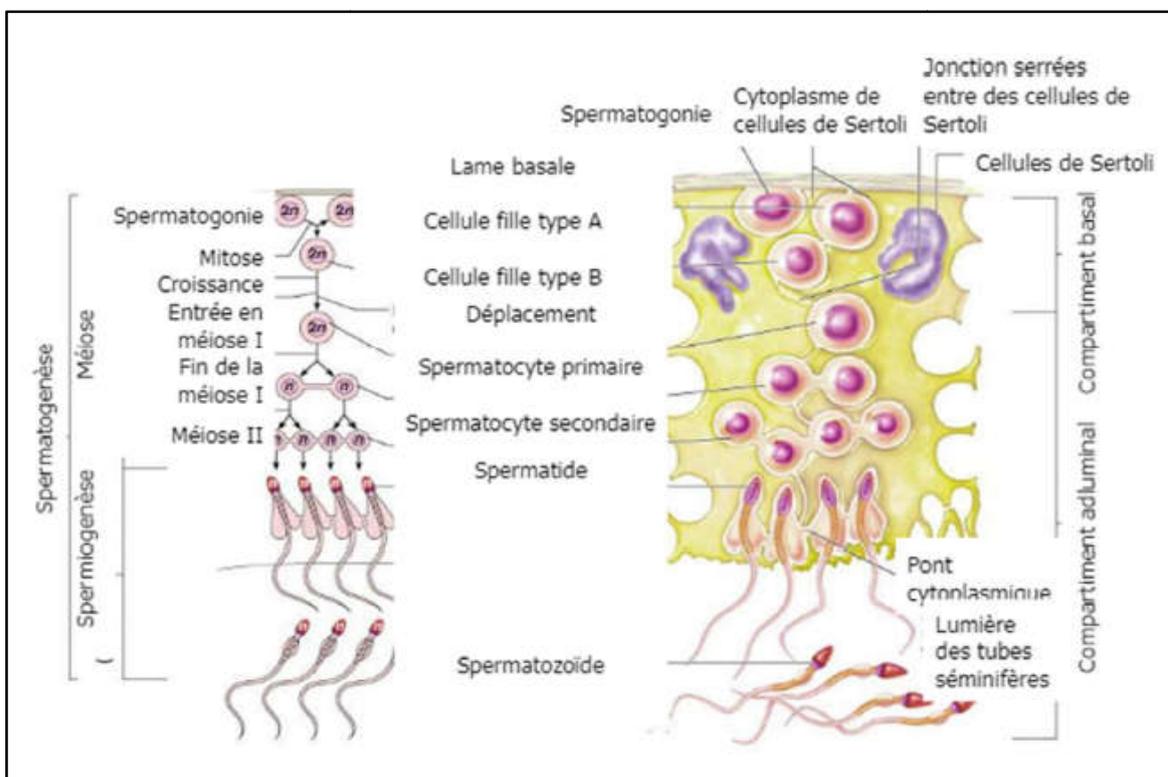


Figure 3 : Différentes étapes de la spermatogénèse (Marieb, 2006).

III- Les défauts de spermatogénèse

Les défauts rencontrés de spermatogénèse les plus fréquentes sont :

- **Oligospermie** : se caractérise par une faible concentration de spermatozoïdes dans le sperme. Cette affection peut être due à des facteurs environnementaux, génétiques ou à des infections (**World Health Organisation, 2010**).
- **L'asthénospermie** : diminution de la motilité des spermatozoïdes. Cette affection peut être causée par une mauvaise alimentation, des infections ou des anomalies génétiques (**Hwang *et al.*, 2011**).
- **La tératospermie** : se caractérise par une augmentation de la proportion de spermatozoïdes anormaux dans le sperme. Les causes peuvent inclure des facteurs environnementaux, des infections ou des anomalies génétiques (**Dohle *et al.*, 2010**).
- **L'azoospermie** : est l'absence de spermatozoïdes dans le sperme. Cette affection peut être causée par des anomalies chromosomiques, des infections, des lésions testiculaires ou une obstruction des voies spermatiques (**Jungwirth *et al.*, 2012**).

IV-La structure générale du spermatozoïde

Le spermatozoïde humain est une cellule de 60 μm de longueur hautement spécialisée. Il est formé par :

- **Une tête aplatie**: qui mesure 4 à 5 μm de longueur sur 2 à 3 μm de largeur. Elle contient le noyau coiffé par l'acrosome.
- **Un col** : qui correspond à la zone de jonction entre la tête et le flagelle. C'est une région très complexe qui renferme l'appareil centriolaire et la pièce connective (PC).
- **Un flagelle** : qui comporte trois parties :

Une pièce intermédiaire (PI) mesurant 4 à 5 μm très riche en mitochondries qui fournissent l'énergie nécessaire au mouvement flagellaire, une pièce principale (PP) : 45 μm et une pièce terminale : 1 à 2 μm (**El fekih, 2018**).

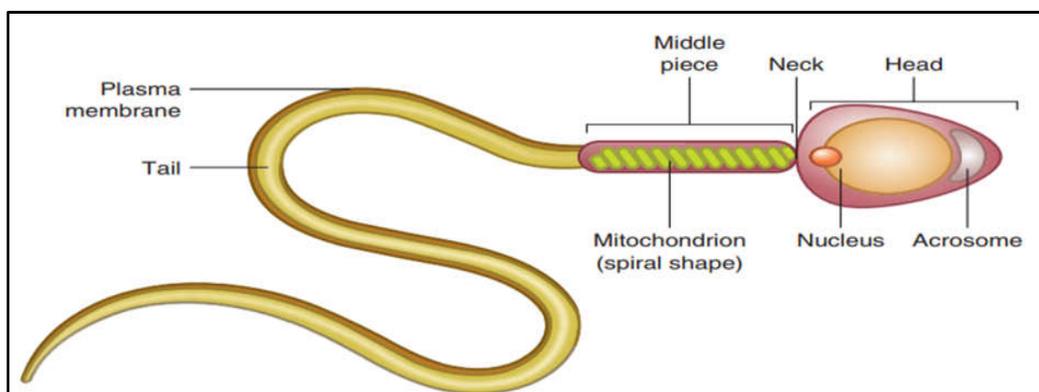


Figure 4 : Structure du spermatozoïde (Arafa *et al.*, 2020).

IV-1-Le sperme

Le sperme est un fluide biologique complexe contenant un très grand nombre de substances secrétées à différents niveaux de l'appareil génital. On estime la production quotidienne de liquide séminal à environ 0,4 ml. Il est constitué de spermatozoïdes en suspension dans les sécrétions d'origine testiculaire et épидидymaire, qui se mélangent avec les sécrétions de la prostate, des vésicules séminales et des glandes bulbo urétrales (glandes de Cowper), au moment de l'éjaculation (**Muhindo *et al.*, 2021**).

Deuxième chapitre : L'infertilité masculine

I- Définition de l'infertilité

L'infertilité est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme l'incapacité d'un couple à procréer ou à mener une grossesse à terme après un an de rapports sexuels réguliers et non protégés (**Zegers-Hochschild *et al.*, 2009**). Il n'est pas rare qu'elle soit définie par d'autres durées, telles que 2 ou 5 ans (**Faasse et Niederberger, 2012**). Aussi, elle peut être raccourcie à 6 mois, en cas de partenaire à un âge avancé (**Frikh *et al.*, 2021**). L'infertilité masculine est définie comme l'incapacité d'un homme à rendre enceinte une femme fertile (**Leslie *et al.*, 2022**).

II- Épidémiologie

L'infertilité représente un réel problème de santé publique et elle est considérée comme une pathologie à part entière. De nos jours, 10–15 % des couples ont des difficultés à procréer (**Leslie *et al.*, 2022**). Dans 50 % des cas, la cause est due à un facteur féminin, dans 20–30 % des cas à un facteur masculin et dans les 20–30 % restant il s'agit de la combinaison de facteurs féminins et masculins. Selon des statistiques mondiales, au moins 30 millions d'hommes sont infertiles (**Agarwal *et al.*, 2015**). L'Afrique et l'Europe de l'Est sont les régions qui présentent les taux les plus élevés de cas d'infertilité masculine (**Inhorn et Patrizio, 2015**).

D'après les enquêtes nationales menées par le ministère de la santé de la population et de la réforme hospitalière entre 1992 et 2002, l'Algérie compte plus de 300.000 couples souffrant de l'infertilité (**Hamdi, 2013**).

III- L'azoospermie

III-1-Définition

L'azoospermie représente l'absence totale des spermatozoïdes dans l'éjaculat (**Wosnitzer *et al.*, 2014**). Elle est confirmée après au moins deux analyses de sperme (spermogramme) montrant le même diagnostic (**Jarvi *et al.*, 2015**). Cette pathologie touche 1 % des hommes dans la population générale : entre 5 à 15 % des hommes infertiles (**Coat *et al.*, 2011**). Ces derniers semblent avoir un risque accru de développer un cancer par rapport à la population générale. Ce risque est plus élevé chez les hommes azoospermiques (**Eisenberg *et al.*, 2013**).

L'azoospermie se divise en deux grands groupes :

III-2-Azoospermie obstructive (AO)

Appelée encore « infertilité excrétoire » dans laquelle le processus de la spermatogenèse est active mais l'obstruction des voies génitales bloque le transport des spermatozoïdes (Arafat *et al.* , 2017). Elle représente entre 30% et 40% des cas d'azoospermie (Yu *et al.* , 2021).

III-3-Azoospermie non-obstructive (ANO)

Appelée encore « infertilité sécrétoire » Dans laquelle la spermatogenèse est inactive et donc les spermatozoïdes sont non générés. Elle représente environ 60% des hommes atteints d'azoospermie. La NOA est une forme sévère d'infertilité masculine, avec des options de traitement limitées et des taux faibles de fécondité. Les facteurs génétiques contribuent à 21%-29% de l'azoospermie non-obstructive et 12 à 41 % de ces cas sont idiopathiques, probablement en raison des facteurs génétiques inconnus ou d'autres facteurs (Arafat *et al.*, 2017).

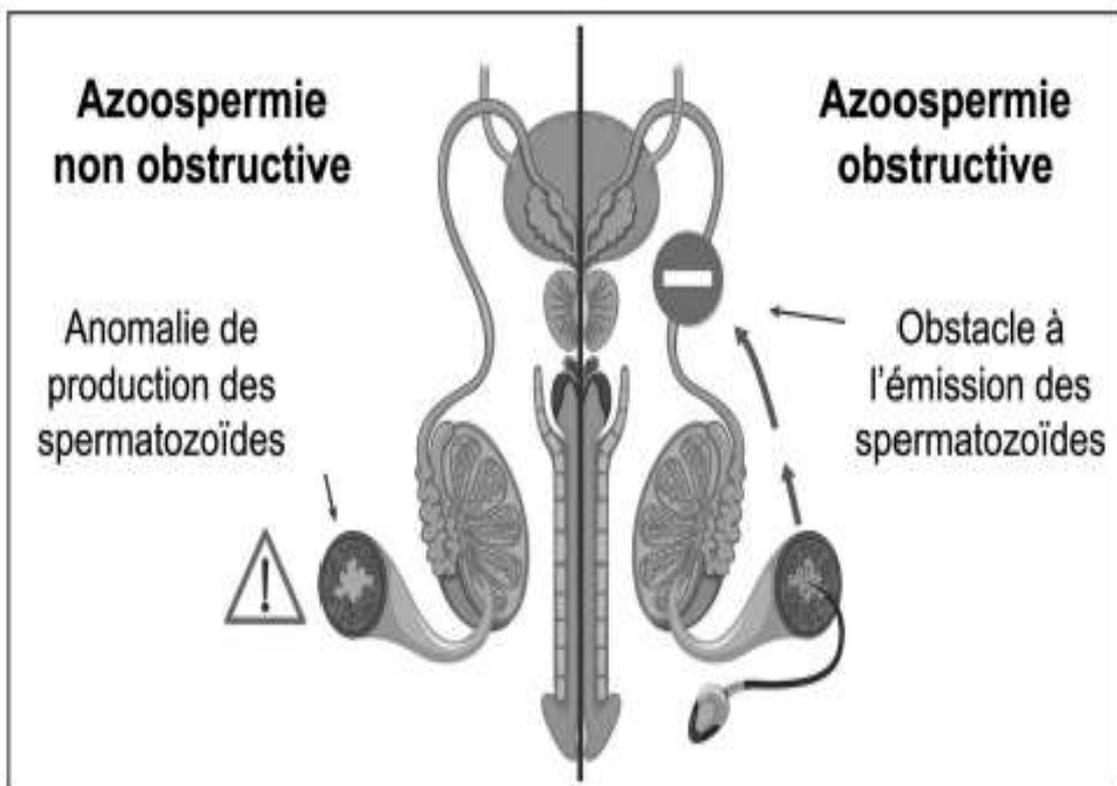


Figure 5 : Représentation schématique des différents types d'azoospermie et de leurs principaux mécanismes (Braham *et al.*, 2021).

IV-Etiologie de l'infertilité masculine

La fertilité masculine suppose qu'un homme soit capable à la fois de produire des spermatozoïdes et d'avoir une vie sexuelle normale. Les étiologies de l'infertilité chez l'homme sont classées en causes d'origines centrales ; qui fait référence à une altération de la production de spermatozoïdes due à un problème hormonal ou à une altération génétique, et causes d'origines périphériques ; qui est liée à des problèmes de qualité du sperme et/ou à des problèmes d'éjaculation. Ces problèmes peuvent être dus à des infections, des varicocèles, des obstructions des voies génitales, ces dernières peuvent être sécrétoires ou excrétoires. **(Muhindo et al., 2021)**. Les causes d'infertilité masculine sont multiples et parfois plurielles chez un même individu, justifiant une enquête clinique et paraclinique méthodique pour les reconnaître et agir sur chacune d'elles. L'enquête étiologique est une étape fondamentale car le pronostic et les options thérapeutiques en dépendent **(Schlosser et al., 2007)**.

Bien que de nombreux facteurs environnementaux et comportementaux puissent influencer la fertilité masculine, il est largement admis que des facteurs génétiques jouent également un rôle important **(Jurewicz et al., 2009)**.

IV-1-Facteurs génétiques

Depuis les années 1970, il est acté que des anomalies chromosomiques et/ou génétiques peuvent affecter le potentiel de fertilité **(Benrhouma et al., 2018)**. Elles représentent environ 15% des patients atteints d'ANO, en effet l'incidence des anomalies génétiques augmente à mesure que la production de sperme diminue, par exemple, environ 15% des hommes atteints d'ANO présentent des anomalies chromosomiques, contre environ 5% de ceux dont la concentration de spermatozoïdes est comprise entre 1 et 10 millions/mL et inférieur à 1% des hommes dont la concentration est supérieure à 19 millions/mL **(Krausz et Riera-Escamilla, 2018)**.

La génétique de l'infertilité est très complexe, car il y a au moins 2000 gènes impliqués dans la spermatogénèse, et les anomalies qui touchent les chromosomes sexuels jouent un rôle très important dans l'infertilité masculine, tels que les récepteurs des androgènes où des mutations dans les gènes des hormones sexuelles masculines peuvent également entraîner une diminution de la production de spermatozoïdes et une altération de la qualité du sperme. **(Krausz et Riera-Escamilla, 2018)**.

IV-1-1- Chromosomes sexuels

Les chromosomes sexuels sont des acteurs principaux de déterminisme sexuel dans tous les organismes multicellulaires. Les deux chromosomes sexuels chez les hommes (X et Y) sont enrichis en gènes spécifiquement ou surexprimés dans le testicule. Les anomalies génétiques des chromosomes sexuels sont les plus fréquemment impliquées dans l'infertilité, surtout masculine (**Guichaoua et al., 2009**).

a- Le chromosome Y

Le chromosome Y humain, spécifiquement mâle, s'est progressivement spécialisé au cours de l'évolution dans des fonctions de déterminisme du sexe et de reproduction. Malgré la petite taille du chromosome Y, des anomalies de structure ont pu être observées au caryotype et leur relation avec le phénotype d'infertilité a permis d'assigner à certaines régions un rôle majeur dans la spermatogenèse (**Ravel et Siffroi, 2009**). Chez les mammifères, le sexe est généralement déterminé par la présence ou l'absence de SRY. C'est un petit gène qui contient un seul exon, code un facteur de transcription qui se lie à des régions spécifiques et aide au contrôle d'autres gènes spécifiques, cette protéine va déclencher des mécanismes spécifiques qui font que le fœtus développe des testicules (gonades males) (**Larney et al., 2014**).

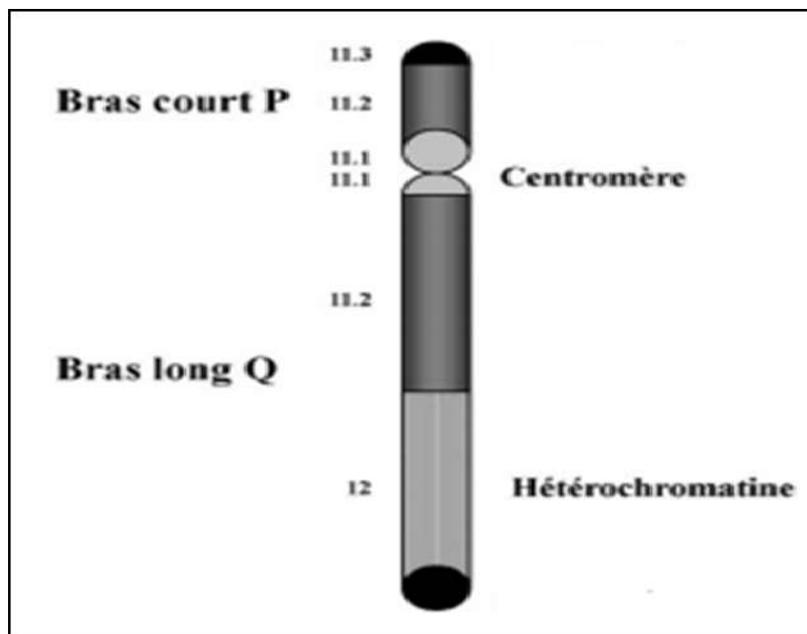


Figure 6: Schéma de la structure globale du chromosome Y (Ravel et Siffroi , 2009).

b- Le chromosome X

Le chromosome X est l'un des deux chromosomes sexuels avec le chromosome Y, il est constitué d'un bras long (Xq) ainsi que d'un bras court (Xp) de chaque côté du centromère.

Il contient 1098 gènes (approximativement 4% du génome humain) dont 99 codent pour des protéines exprimées dans les testicules (**Ross *et al.*, 2005**).

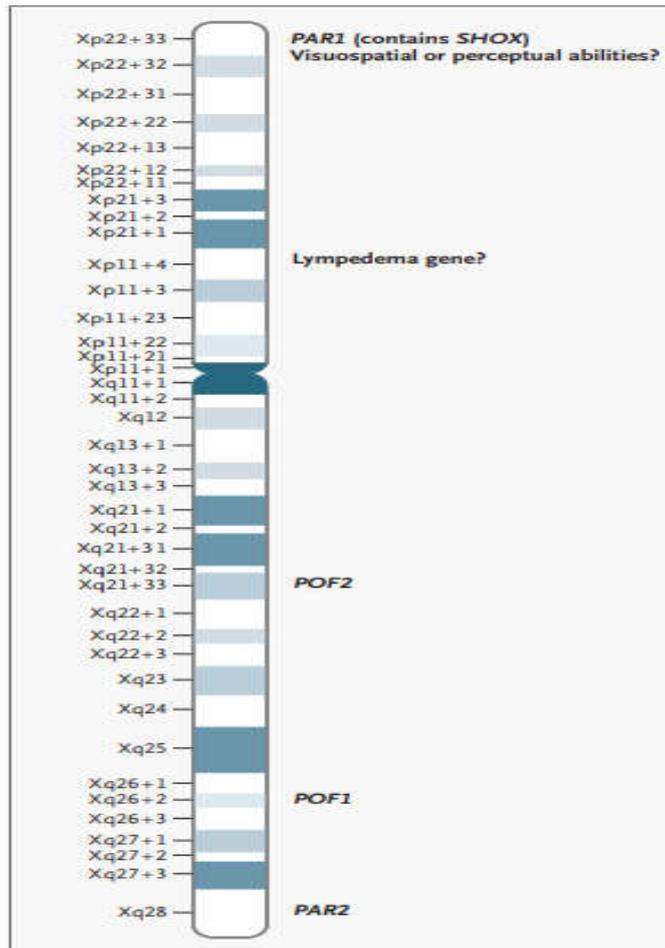


Figure 7 : Structure du chromosome X et ses différentes régions (Sybert et Mc Cauley, 2004).

IV-1-2- Anomalies de nombre

Une anomalie du nombre caractérisée par la présence d'un chromosome en plus ou en moins du jeu chromosomique diploïde normal 46 chromosomes. On distingue les trisomies excès d'un chromosome (47 chromosomes), des monosomies perte d'un chromosome (45 chromosomes) (**Dimassi *et al.*, 2017**).

- **Le syndrome de Klinefelter XXY**

Le syndrome de Klinefelter (SK) a longtemps été considéré comme un modèle de stérilité masculine totale et définitive (**Plotton *et al.*, 2011**). C'est la cause génétique la plus commune de l'azoospermie, avec une formule chromosomique 47, XXY. Il est retrouvé chez 10-12% des patients azoospermiques (**Cioppi *et al.*, 2021**).

Le caryotype 47, XXY est le plus souvent acquis à la suite d'une non-disjonction lors de la gamétogenèse parentale, d'origine paternelle (53 %) ou maternelle (44 %) et ce n'est que dans 3 % des cas que l'origine est une erreur de division post-zygotique.

La présence de chromosome X supplémentaire entraîne un défaut de spermatogenèse avec hypotrophie testiculaire, une augmentation des taux plasmatiques de gonadotrophines, et se manifeste très souvent par un hypogonadisme masculin (**Ravel *et al.*, 2011**).

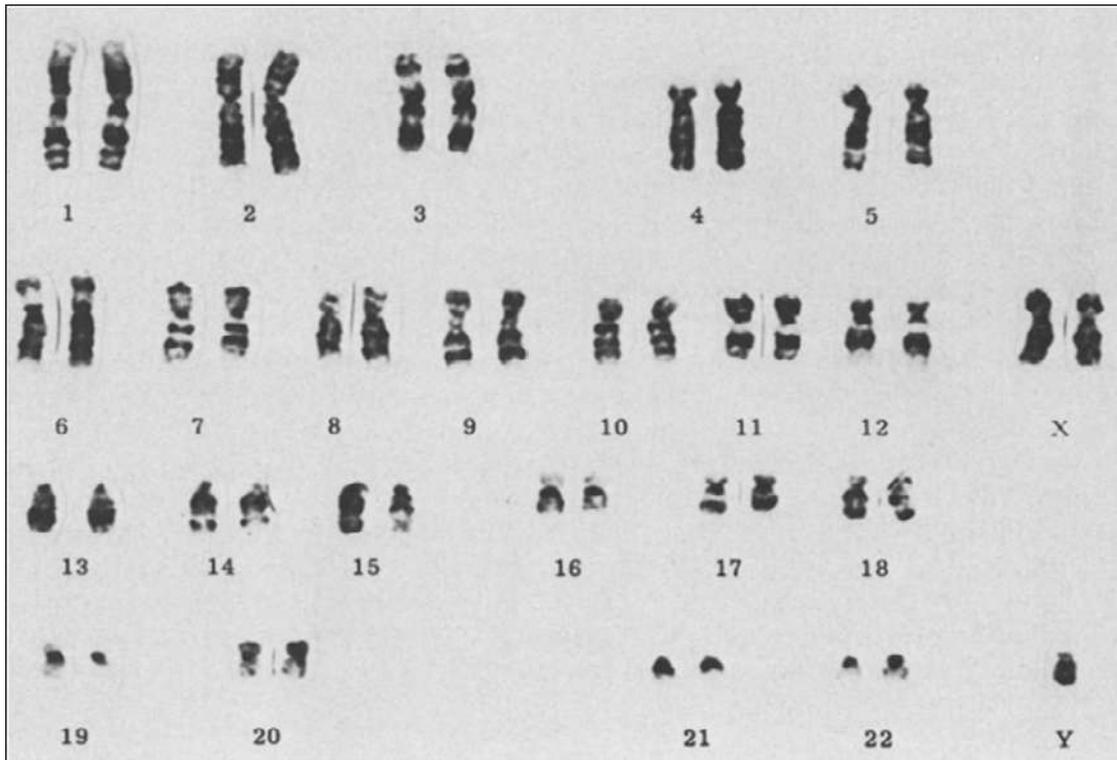


Figure 8: Caryotype du syndrome de Klinefelter 47, XXY (Zang, 1984).

IV-1-3- Anomalies de structure

Elles sont la conséquence d'un réarrangement du matériel chromosomique. Ces réarrangements peuvent concerner un seul chromosome ou plusieurs. On distingue les anomalies impliquant un seul chromosome et les anomalies touchant deux chromosomes. Beaucoup plus rarement l'anomalie peut toucher plus de deux chromosomes, on parle alors d'anomalie chromosomique complexe (**Dimassi *et al.*, 2017**).

- **Les microdélétions du chromosome Y**

Les microdélétions du chromosome Y sont considérées comme des anomalies chromosomiques de structure. Elles incluent un réarrangement anormal au niveau des chromosomes sans perte de matériel génétique (**Ho Yuen *et al.*, 2003**).

Ces anomalies sont retrouvées chez près de 15 % des hommes atteints d'azoospermie non-obstructive et 5 à 10 % des hommes atteints d'oligospermie sévère (Ferlin *et al.*, 2007).

Le rôle fondamental du bras long du chromosome Y (Yq) a été mis en évidence grâce aux travaux de Tiepolo et Zuffardi en 1976. Ces derniers ont identifié, en analysant le caryotype de six hommes azoospermiques, une large délétion du bras long du chromosome Y. L'analyse de cette région, dénommée AZF pour azoospermia factor, a permis de la subdiviser en trois sous-région appelées AZFa, AZFb et AZFc. (Tiepolo et Zuffardi, 1976).

Les délétions Yq concernent dans 80 % des cas la région AZFc, dans 1 à 5 % des cas la région AZFb et dans 0,5 à 4 % des cas la région AZFa. En plus de ces délétions, il est possible d'observer des délétions complètes de la région AZF ou AZFbc. Dans tous les cas, cela s'accompagne d'une azoospermie (Krausz *et al.*, 2013).

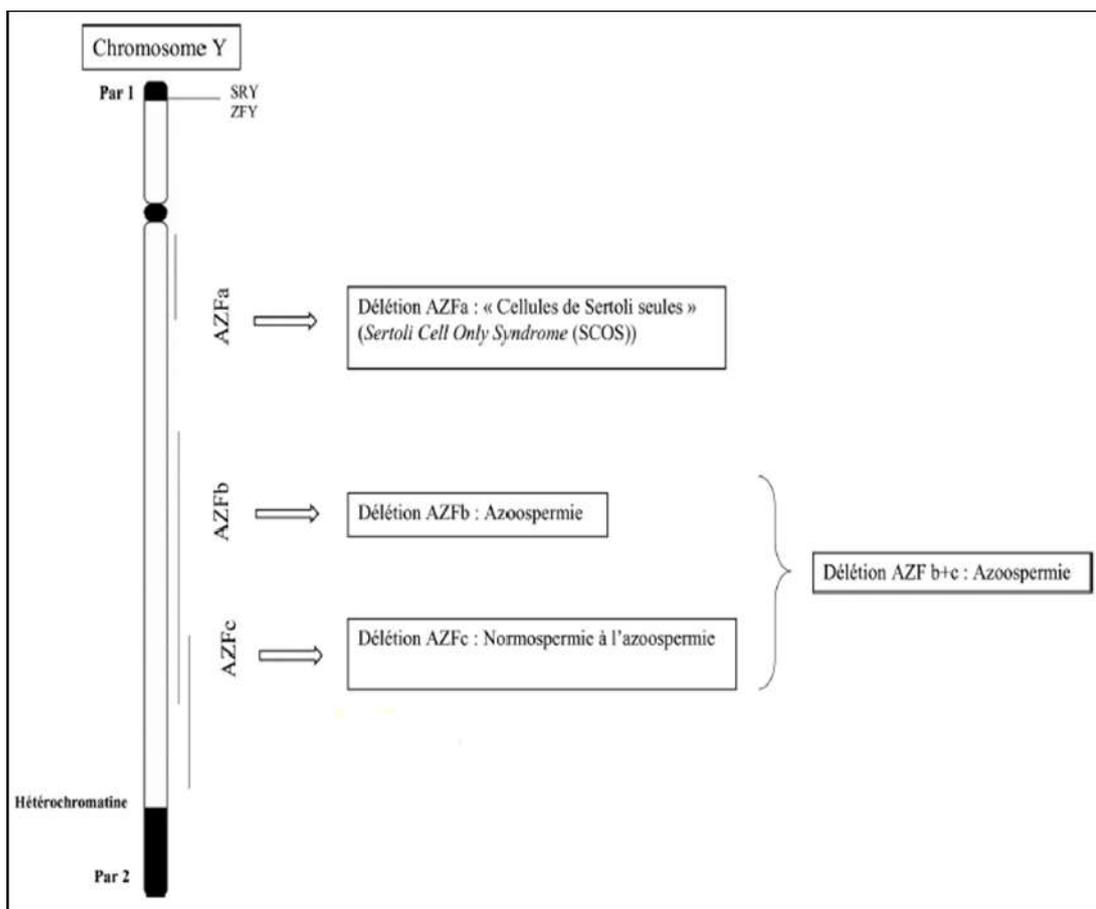


Figure 9 : Schéma du chromosome Y et effets des délétions d'AZFa, AZFb et AZFc (Ben Rhouma *et al.*, 2018).

IV-1-4- Mutation du gène *TEX11*

Des études ont démontré que les gènes spécifiques des cellules germinales sont enrichies dans le chromosome X des mammifères. De nombreux gènes liés à l'X sont exprimés dans les testicules, et leurs fonctions dans la spermatogenèse ont été progressivement reconnues dans des modèles knock-out et des sujets présentant des mutations (**Sha *et al.*, 2018**).

L'incidence des mutations de ce gène *TEX11* dans l'infertilité primaire masculine est élevée, à environ 1 %, et la dérégulation du gène a été mise en cause dans l'apoptose des spermatozoïdes, les troubles de maturation et l'azoospermie. Initialement, une délétion de 90 kb (englobant les exons 9, 10 et 11) dans le gène *TEX11* a été identifiée chez des patients azoospermiques présentant un arrêt méiotique homogène ou mixte. Cette délétion a entraîné la perte de 79 acides aminés du domaine de sporulation spécifique à la méiose de la protéine TEX11 (Spo22). Des mutations ont été observées dans 2,4% des patients atteints d'ANO. (**Yatsenko *et al.*, 2015**).

V- Diagnostic de l'infertilité masculine

Le diagnostic d'une infertilité masculine nécessite une approche méthodique, tout d'abord clinique, dans le but d'identifier tous les facteurs potentiels d'infertilité. Les examens biologiques et radiologiques permettent de confirmer le ou les diagnostic(s), d'évaluer le pronostic et les possibilités de traitement de l'infertilité (**Schlosser *et al.*, 2006**). Le diagnostic donne donc l'avantage pour connaître les raisons de l'infertilité masculine.

D'abord un couple infertile passe avant tout par un interrogatoire, suivi d'un examen clinique centré surtout sur l'appareil génital. Après, arrive à la demande, des examens complémentaires (**Zeghib, 2009**) :

V-1- Spermogramme

Le spermogramme est un premier élément incontournable d'appréciation de la fertilité masculine, il est un examen clé qui permet d'analyser le sperme d'un homme qui doit être recueilli après 2 à 5 jours d'abstinence (**Schlosser *et al.*, 2006**).

Il est obligatoire pour poser le diagnostic d'infertilité dans un couple, bien que la sensibilité de ce test reste limitée. L'examen spermogramme est effectué pour l'évaluation de la fertilité et infertilité masculine selon divers critères à mesurer telle que le volume, pH, la concentration, la morphologie et d'autres critères complémentaires (**Bâali et Boukeloua, 2020**), en les comparant aux normes optimales : pH de l'éjaculat supérieur ou

égal à 7,2 , concentration des spermatozoïdes supérieure à 20 millions/ml ou nombre total de spermatozoïdes par éjaculat supérieur à 40 millions (**Schlosser *et al.*, 2006**).

Un contrôle du spermogramme ne peut se faire qu'après un délai de 2 à 3 mois, afin de couvrir le cycle complet de la spermatogenèse (**El-Hamzaoui et Dikoumba, 2005**).

Tableau I : Récapitulatif des paramètres du spermogramme défini par l'OMS
(El-Hamzaoui et Dikoumba, 2005).

Paramètre	Normes OMS	Définition de l'anomalie
Volume	≥ 2 ml	<2ml : hypospermie >6ml : hyperspermie
Numération	$\geq 20 \times 10^6$ /ml	0 : Azoospermie < 20×10^6 /ml: Oligozoospermie > 200×10^6 /ml: Polyzoospermie
Mobilité (majorité progressifs)	≥ 50 %	<50 % : asthénozoospermie
Morphologie normale	≥ 50 %	<50 % : tératozoospermie
Vitalité	≥ 50 %	<50 % : néirozoospermie
Leucocytes	< 10^6 /ml	$\geq 10^6$ /ml : leucospermie

V-2- Le Caryotype

Les anomalies du caryotype représentent une cause majeure de l'infertilité masculine, environ 15 % des patients azoospermiques présentent une anomalie du caryotype (**Mierla *et al.*, 2014**).

Les techniques de cytogénétique ont beaucoup évolué depuis la découverte d'un nombre exact de chromosomes chez l'homme en 1956. Le caryotype standard est utilisé depuis 1959 en cytogénétique classique. Il permet initialement une résolution de 10 à 15 Mb (**Rezgoune-Chellat, 2013**). Historiquement, le caryotype est le premier examen permettant une analyse globale du génome qui a permis d'identifier des anomalies chromosomiques (**Dimassi *et al.*, 2017**) . À ce jour, le caryotype reste un facteur pronostique puissant et un élément de base car comme mentionné. Il est une image globale du génome, ce qui justifie la prise en compte de nombre d'anomalies les plus fréquentes et les plus significatives sur le plan pronostique (**Dastugue, 2003**).

La réalisation d'un caryotype est basée sur la culture cellulaire avec un blocage du cycle cellulaire au stade métaphase de la mitose, et pour pouvoir différencier les 46 chromosomes, des techniques de dénaturation sont nécessaires : « techniques de banding chromosomique », consistent à dénaturer la charpente protéique des chromosomes. Deux types sont le plus souvent utilisés : la technique des bandes G obtenues après une dénaturation enzymatique par la trypsine, et la dénaturation en bandes R (marquage inverse des bandes G), obtenues par la dénaturation thermique (**Dimassi *et al.*, 2017**).

La première introduction de technique de bandes sur les chromosomes humains est due à l'utilisation d'un marquage fluorescent (moutarde de quinacrine). Et à partir de 1970, d'autres techniques de bandes utilise souvent le colorant de Giemsa (**Berger, 2007**).

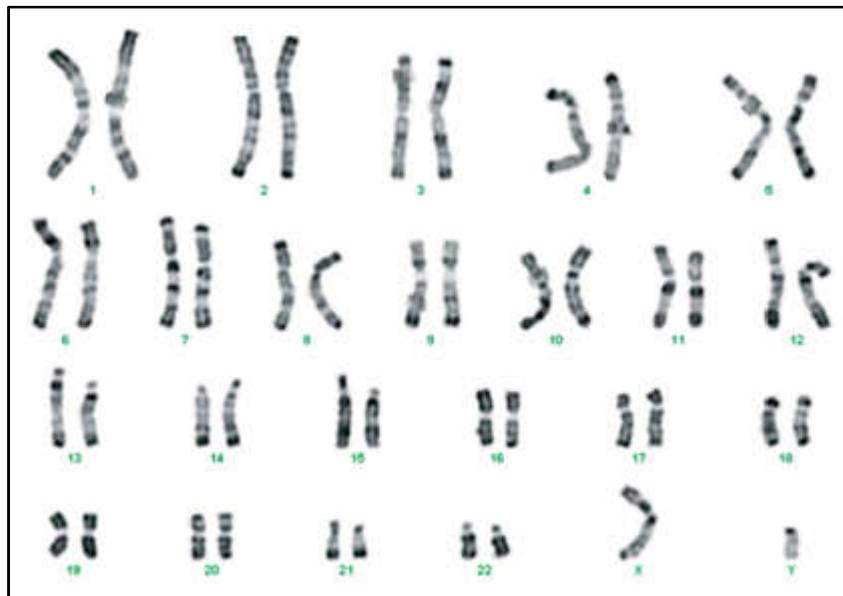


Figure 10 : Caryotype masculin normal en bandes R (Dimassi *et al.*, 2017).

V-3- La polymérase chain réaction (PCR)

La PCR est une technique de biologie moléculaire d'une puissance exceptionnelle permettant d'amplifier spécifiquement, et d'une manière exponentielle, une séquence d'ADN donnée. Les taux d'amplification peuvent atteindre 10^9 et permettent alors de mettre en évidence la présence d'une molécule unique d'ADN. La PCR peut être considérée comme une technique de clonage moléculaire (en tubes) et trouve, à ce titre, de très nombreuses applications en recherche fondamentale. Son utilisation la plus évidente concerne cependant le diagnostic médical de maladies génétiques et d'infections par un pathogène (**Larzul, 1989**). Par exemple, le diagnostic d'une micro-délétions du chromosome Y.

Troisième chapitre : Le gène *TEX 11***I- Présentation**

La régulation de la spermatogenèse implique l'expression d'un grand nombre de gènes dans un programme spécifique aux cellules et aux stades précis. Une compréhension exhaustive de la spermatogenèse nécessite l'identification et la caractérisation fonctionnelle des quelque 2300 gènes qui sont principalement exprimés dans les testicules. Dans les années 2000, l'utilisation de techniques d'ADN complémentaire (ADNc) et la comparaison des profils de transcription des gènes dans différentes conditions physiologiques ont permis l'identification de gènes spécifiquement exprimés dans les testicules (appelés gènes exprimés dans les testicules) : TestisExpressed ou *TEX* (Bellil *et al.*, 2021).

Le gène *TEX* a été signalé pour la première fois en 2001 par Wang *et al.* Dix des 23 nouveaux gènes spécifiques des cellules germinales, hautement ou exclusivement exprimés dans les testicules (*TEX11* à 20), n'avaient pas été annotés. La plupart de ces gènes ont depuis été trouvés à avoir une fonction dans la spermatogenèse, et des gènes *TEX* supplémentaires ont été identifiés. À ce jour, 69 gènes *TEX* ont été décrits chez les humains ou les modèles de souris. Cependant, ces gènes ne constituent pas une famille homogène; contrairement aux gènes HOX (homeobox) ou PAX (boîte appariée) ou RHOX (homeobox reproductif lié à l'X) avec une haute identité de séquence et des fonctions très similaires, la seule caractéristique commune des gènes *TEX* est leur expression (uniquement ou principalement) dans les testicules. Après le rapport de Wang *et al.*, de nouveaux gènes spécifiques aux testicules ont été inclus dans la famille *TEX* et numérotés séquentiellement (Bellil *et al.*, 2021).

II- Identification et localisation du gène *TEX 11* :

Le Testis Expressed 11 (*TEX11*) est un gène récemment identifié impliqué dans la pathogénicité de l'infertilité masculine (Qureshi *et al.*, 2021), aussi connu sous les noms : TGC1; ZIP4; MZIP4; Spo22; TSGA3; ZIP4H; SPGFX2. Il s'agit d'un gène lié à l'X exprimé uniquement dans les cellules germinales mâles, localisé sur le chromosome X en position Xq13.1. Il contient 36 exons (NCBI, 2023), et code pour une protéine de 104 kDa. (Sha *et al.*, 2018). Il est actuellement le gène le plus couramment associé à l'azoospermie (Bellil *et al.*, 2021). La fréquence des mutations rares de *TEX11* est significativement plus élevée chez les hommes azoospermiques, suggérant que *TEX11* est essentiel pour la spermatogenèse humaine et que les mutations dans ce gène unique lié à l'X sont la cause d'infertilité chez environ 1 % des hommes azoospermiques (Boroujeni *et al.*, 2018).

III- Structure

TEX11 contient un domaine spécifique de méiose (SPO22) et de nombreuses régions promotrices transloquées (TPR) de fonction inconnue (Miyamoto *et al.*, 2017).

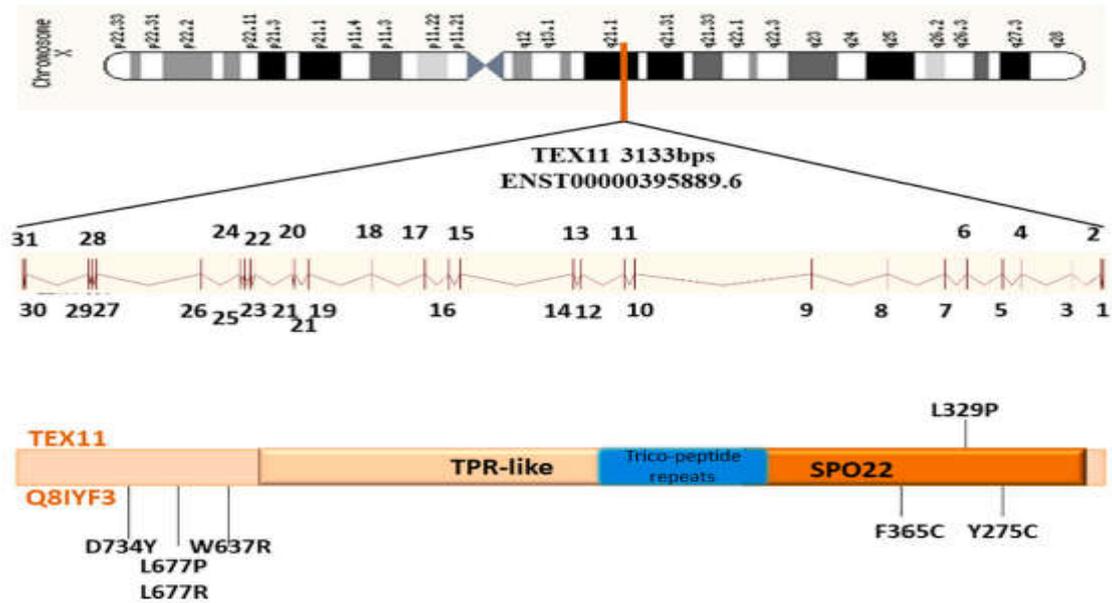


Figure 11: Structure du gène *TEX11* et organisation de la protéine avec toutes les nsSNP repérées cartographiées dans les domaines fonctionnels (Qureshi *et al.*, 2021).

Les TPR sont des modules d'interaction protéine-protéine composés de répétitions hélice-tour-hélice qui apparaissent généralement en tandem et s'emboîtent les uns dans les autres pour former des structures superhélicales avec diverses courbures pouvant fournir des surfaces d'accrochage pour d'autres molécules (Miyamoto *et al.*, 2017).

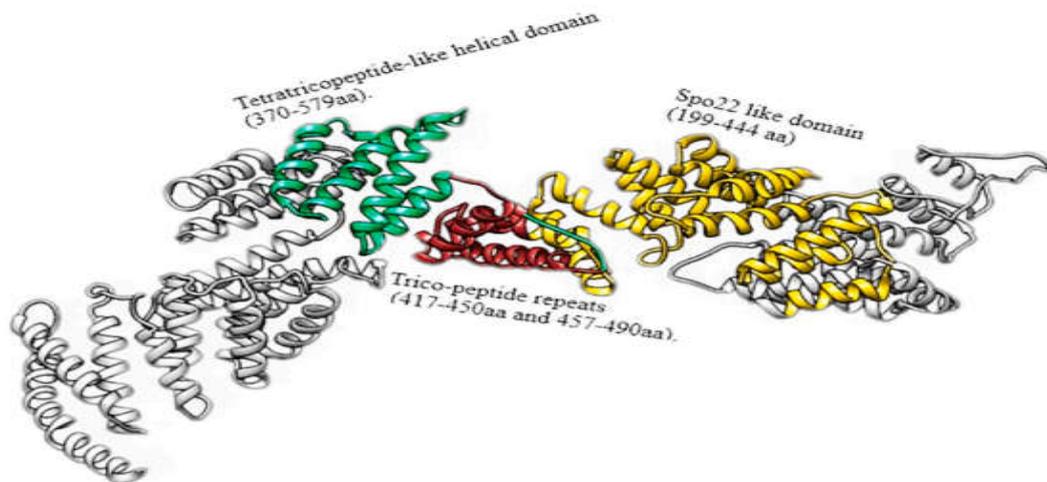


Figure 12: Modèle 3D de la protéine *TEX11* avec l'organisation des domaines et motifs (Qureshi *et al.*, 2021).

La protéine TEX11 est observée dans le cytoplasme et les noyaux des spermatogonies de type B, avec le niveau le plus élevé dans les spermatocytes zygotènes et un niveau basal dans les spermatocytes tardifs en pachytène (Sha *et al.*, 2018).

IV-Le rôle du gène *TEX11*

La création de souris déficientes en *TEX11* a permis aux chercheurs d'élucider le rôle de la protéine codée dans la spermatogenèse. En conséquence, cette dernière a été altérée en raison d'une asynapsie chromosomique au stade pachytène et d'un faible niveau de formation de crossing-overs au stade anaphase I. Les spermatocytes déficients en *TEX11* subissent principalement une apoptose au stade pachytène, tandis que les cellules survivantes présentent une non-disjonction chromosomique lors de la première division méiotique, ce qui provoque la mort cellulaire et l'infertilité masculine (Bellil *et al.*, 2021).

L'expression spécifique de la protéine TEX11 dans les spermatogonies et les spermatocytes suggère que *TEX11* joue un rôle clé dans les premiers stades du développement des cellules germinales. De plus, *TEX11* a été identifié comme le premier facteur spécifique de la méiose codé sur le chromosome X chez la souris (Sha *et al.*, 2018).

Il régule la synapse des chromosomes homologues et la réparation des cassures de brin double d'ADN. Ainsi, il est essentiel pour la formation du complexe synaptonémal et du chiasma lors du croisement chromosomique (Miyamoto *et al.*, 2017).

V-Les mutations

Les mutations de *TEX11* sont diverses et présentent différentes formes, telles que des mutations faux-sens et silencieuses, des altérations introniques, des mutations par décalage de cadre de lecture, et des délétions hémizygotés. Actuellement, 46 mutations différentes de *TEX11* ont été identifiées, dont 24 chez des hommes azoospermiques et 22 chez des sujets fertiles. Les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) ont un impact majeur sur le pourcentage de spermatozoïdes normaux. Les SNP dans le gène *TEX11* ont montré une forte association avec l'infertilité masculine idiopathique (Sha *et al.*, 2018).

Les mutations hémizygotés de *TEX11* étaient une cause fréquente d'arrêt de la méiose et d'azoospermie chez les hommes infertiles (Yatsenko *et al.*, 2015).

Tableau II: Variantes des gènes *TEX* identifiées uniquement chez les hommes atteints d'azoospermie et/ou d'infertilité (Bellil *et al.*, 2021).

Étude	Changement de nucléotide	Changement de protéine	Type de mutation	Exon/ intron
Krausz <i>et al.</i>, 2020	c.84_651del	p.28del189aa	délétion	Exon 4–9
Cannarella <i>et al.</i>, 2020	c.776C → T	p.Thr259Ile	mutation faux-sens	Exon 9
Sha <i>et al.</i>, 2018	c.2653G → T	p.W856C	mutation faux-sens	Exon 29
Nakamura <i>et al.</i>, 2017	c.511A → G	p.Met171Val	mutation faux-sens	Exon 8
Yatsenko <i>et al.</i>, 2015	c.450C → T	p.A150A	mutation d'épissage	Exon 7
	c.511A → G	p.M171V	mutation faux-sens	Exon 8
	c.652del237bp	p.218del79aa	délétion	Exons 10– 12
	c.792 + 1G → A	p.L264spl d	mutation d'épissage	Intron 11
	c.1837 + 1G→C	p.R612spl d	mutation d'épissage	Intron 22
Yang <i>et al.</i>, 2015	c.-17 T→C	/	altération intronique	Intron 3
	c.-48G→A	/	altération intronique	Intron 5
	c.349 T→A	p.W117R	mutation faux-sens	Exon 6
	c.405C→T	/	mutation silencieuse	Exon 6
	c.424G→A	p.V142I	mutation faux-sens	Exon 7
	c.466A→G	p.M152V	mutation faux-sens	Exon 7
	c.515A→G	p.Q172R	mutation faux-sens	Exon 7
	c.731C→T	p.T244I	mutation faux-sens	Exon 10
	c. + 42C→A	/	altération intronique	Intron 10
	c.-28 T→C	/	altération intronique	Intron 12
	c.-64G→A	/	altération intronique	Intron 15
	c.1258Ins (TT)	1258GATG→TTGG TA	Mutation par décalage du cadre de lecture	Exon 16
	c. + 16A→G	/	altération intronique	Intron 20
	c.-1G→A	/	altération de l'accepteur d'épissage placer	Intron 21
	c.-37A→G	/	altération intronique	Intron 22
	c.-44C→T	/	altération intronique	Intron 23
	c. + 119G→A	/	altération intronique	Intron 24
	c.2243 T→C	p.V748A	mutation faux-sens	Exon 26
	c.2319 T→C	/	mutation silencieuse	Exon 27
	c.-55A→C	/	altération intronique	Intron 27
	c.-44A→G	/	altération intronique	Intron 28

Deuxième partie :

Patients et méthodes

I- Lieu et durée de l'étude

Le travail a été réalisé au laboratoire de diagnostic génétique et plateforme microscopie du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT), pour une période de quatre mois (du 18 février au 14 juin 2023).

II- Recrutement des patients infertiles

II-1- Patients

Les patients inclus dans cette étude ont été recrutés au niveau du laboratoire de diagnostic génétique et plateforme microscopie, proviennent tous des régions de l'est algérien. La cohorte comprend 23 patients.

II-2- Critères d'exclusion

Nous avons exclu les sujets atteints du syndrome de Klinefelter, ceux ayant des microdélétions du chromosome Y ainsi que les patients atteints d'azoospermie obstructive.

II-3- Critères d'inclusion

Nous avons inclus les sujets atteints d'azoospermie non obstructive et qui ne figurent pas dans les critères d'exclusion.

III- Méthodologie

III-1- Extraction d'ADN à partir de sang total par salting out

➤ Principe

L'extraction d'ADN consiste à libérer l'ADN des cellules dans les quelles il est enfermé, à le purifier des autres composants de la cellule et à le concentrer pour pouvoir l'analyser. Pour cela, différentes techniques d'extraction d'ADN sont utilisées. selon **Miller et al., (1988)**, la Procédure d'extraction de l'ADN à partir de sang total par la méthode de salting out peut être divisée en trois étapes principales :

- Lyse et élimination des globules rouges.
- Lyse des globules blancs et élimination des protéines.
- Extraction et lavage de l'ADN (**Annexe 1**).

III-2- Génotypage

Le génotypage du gène *TEX11*, pour le polymorphisme (rs143246552) a été réalisé par PCR/RFLP. La technique RFLP, est basée sur la différence de la taille des amplicons.

La détermination du génotype a été effectuée en plusieurs étapes :

- PCR
- Contrôle du produit PCR sur gel d'agarose à 2 %
- Digestion du produit de PCR par l'enzyme de restriction NlaIII

- Séparation des produits de digestion par migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 3% et distinction des différents génotypes sous UV.

III-2-1- Amplification de la région d'intérêt

Pour prospecter le polymorphisme T/C (rs143246552) du gène *TEX11* (Annexe 2). Nous avons amplifié par PCR une partie de la région GRCh38.p14 du chromosome X en Exon 7. Les séquences des amorces utilisées sont mentionnées dans le tableau III.

Tableau III : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de la région d'intérêt.

Amorces	Séquence (5' → 3')	Taille de la région amplifiée(Pb)
<i>TEX 11</i> (F)	5'- ATAGATTCCAATCAGCATTAGTAACATC-3'	563Pb
<i>TEX 11</i> (R)	5'- AGGATTCAATATTTTATCCAATATTCCC -3'	

III-2-2- Polymérase chain réaction (PCR)

a- Protocole

La PCR permet de produire de manière exponentielle des quantités importantes d'ADN amplifié à partir d'un échantillon initial d'ADN, elle comporte trois étapes qui se dérouleront à des températures différentes de façon cyclique :

- Première étape : Dénaturation thermique

Les molécules d'ADN sont dénaturées par chauffage de quelques minutes à une température élevée (94 ou 95°C). Ainsi, l'ADN perd sa structure caractéristique en double hélice et est dénaturé en ADN simple brin.

- Deuxième étape : Hybridation des amorces

Elle est généralement comprise entre 50°C et 60°C selon l'amorce utilisée. Les amorces s'hybrident chacune sur leur brin d'ADN cible grâce à l'appariement des bases complémentaires.

- Troisième étape : Élongation et extension des amorces

La température est à nouveau élevée à environ 72°C, c'est la température optimale pour l'activité enzymatique de la Taq polymérase.

Les étapes de dénaturation, d'hybridation et d'extension sont répétées pour produire des quantités exponentielles d'ADN amplifié.

b- Préparation du milieu réactionnel de la PCR

Un milieu réactionnel de la PCR ou un mix PCR d'un volume final de 20µl a été préparé. La quantité de chaque composant est multipliée par le nombre d'échantillons. Le mix comprend :

- **Les dNTP** : (DésoxyNucléotides-TriPhosphates) composés de : dATP, dTTP, dGTP, dCTP. Ils sont les éléments de base utilisés par la Taq-polymérase pour la synthèse des nouveaux brins d'ADN complémentaires.

- **La Taq polymérase** : (extraite de bactérie « *Thermus aquaticus* »). Elle est thermorésistante avec une température optimale d'action de 72°C. C'est une enzyme de la polymérase utilisée pour synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin d'ADN matrice après s'être fixée à une amorce.

- **Un tampon** : (**Buffer**) avec le (**MgCl₂**) qui est un cofacteur pour la Taq-polymérase. Ces deux composants définissent un milieu avec un pH et une concentration saline optimaux pour le bon fonctionnement de l'enzyme.

- **H₂O** : utilisée comme solvant pour dissoudre tous les autres réactifs, pour diluer les échantillons d'ADN et les amorces, et pour transférer la chaleur à tous les composants de la réaction.

- **Les amorces** : ce sont des fragments courts d'ADN, correspondant au polymorphisme rs du gène *TEX 11*. Capables de s'hybrider sur l'un des deux brins d'ADN de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. Pour cette étape, les réactifs utilisés dans la PCR doivent d'abord être dilués selon la formule suivante : $C1 \times V1 = C2 \times V2$

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).

Les composants du mélange réactionnel de PCR pour l'amplification de la région d'intérêt sont mentionnés en **Annexe 3**.

Le programme du thermocycleur pour l'amplification de la région d'intérêt (durée : 02 h et 18 minutes) est mentionné en **Annexe 4**.

III-2-3- Contrôle des produits de la PCR

Pour vérifier le bon déroulement de la technique de PCR, un contrôle est effectué par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% dans une cuve horizontale.

Le gel d'agarose est préparé en mélangeant de l'agarose avec du tampon TBE 1X (**Annexe 6**), et du gel stain. Après polymérisation, le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TBE 1X. Les échantillons de PCR, accompagnés de BBP (Bleu de Bromophénol), sont déposés dans les puits du gel, et un marqueur de poids moléculaire est ajouté dans le premier puits. Sous une tension de 80 volts pendant une heure, les fragments d'ADN migrent à travers le gel en fonction de leur taille, permettant leur séparation et leur visualisation.

III-2-4- Digestion des produits PCR

Le polymorphisme (rs143246552) du gène *TEX 11* a détecté un site de restriction pour NlaIII (**Annexe 5**), enzyme extraite de la bactérie *Neisseria lactamica* reconnaît la séquence 5'-CATG-3', en coupant après le G pour générer une surplombante de quatre bases en 3'.



Figure 13: Représentation schématique du site de restriction de l'enzyme NlaIII (Morgan *et al.*, 1996).

Les composants du mélange de la digestion sont présentés en **Annexe 7**.

Les tubes de digestion sont incubés à 37 °C pendant une nuit, la digestion est arrêtée par l'augmentation de la température à 80°C pendant 20min de temps.

➤ Dépôts des échantillons

- Dépôt de 5 µl sur gel d'agarose à 3%.
- Migration à 100 V pendant 2h dans du TBE 1X et révélation aux UV.

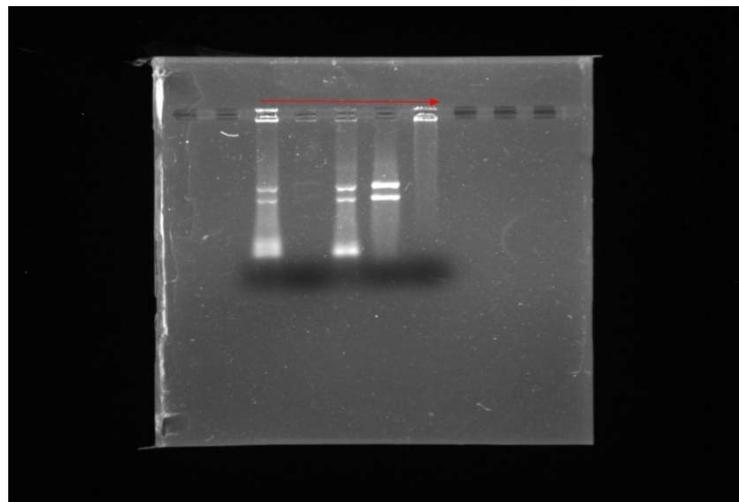


Figure 14: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus après digestion du produit de PCR du gène *TEX 11* par NlaIII.

Troisième partie :

Résultats et discussion

I-Caractéristiques principales des patients

Dans le cadre de notre étude menée au Centre de Recherche en Biotechnologie, nous avons effectué le génotypage du gène *TEX11* sur un échantillon total de 23 sujets.

II-Résultats

II-1- Caryotype

L'étude cytogénétique a démontré un caryotype normal (46, XY) chez l'ensemble de nos patients, ce résultat a justifié leur inclusion dans nos échantillons.

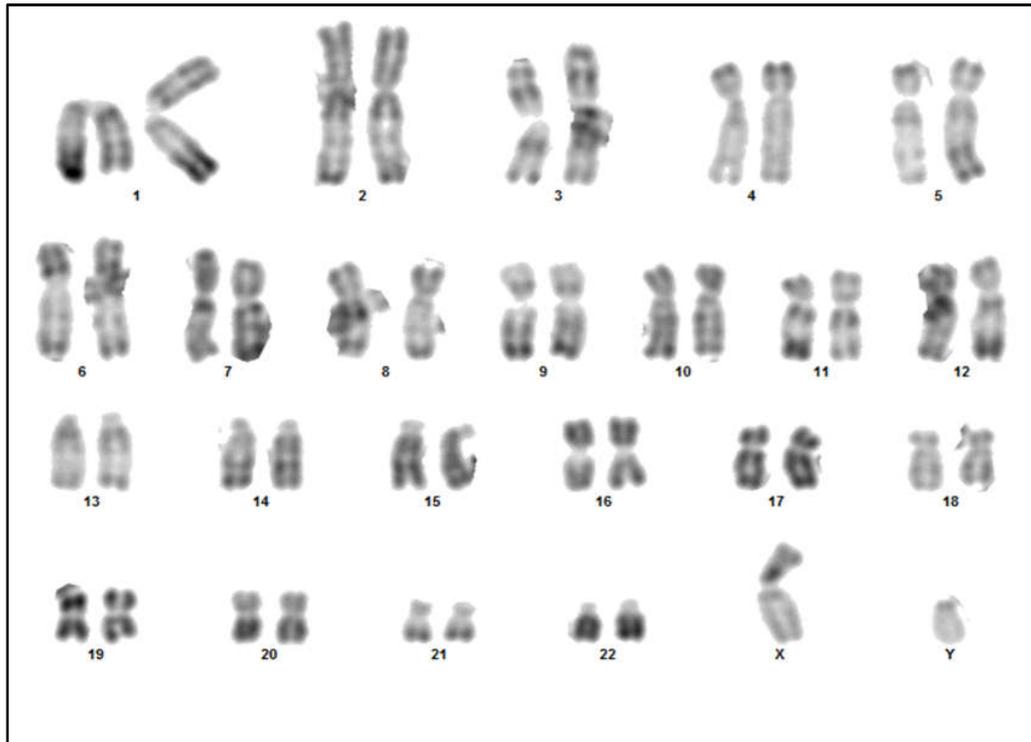


Figure 15 : caryotype d'un homme atteint d'azoospermie non obstructive

Le syndrome de Klinefelter est la première pathologie liée à l'infertilité masculine, et la première recherchée dans l'azoospermie non obstructive, ce syndrome est causé par un caryotype à (47, XXY) ce qui n'a pas été le cas chez nos patients inclus dans cette étude. Sa prévalence est proche de 2 pour 1000 naissances masculines (krausz *et al.*,2018) , mais les caractères phénotypiques de ce syndrome nous ont permis de différencier les patients atteints des patients sains.

II-2-PCR

Afin de détecter d'éventuelles altérations au niveau du chromosome Y qui pourraient être responsables de cette infertilité, une étude moléculaire est nécessaire. Des micro-délétions de Yq11 (AZF sub-region) ont été retrouvées chez 2 des 25 patients ayant un caryotype normal (8 %) ce qui a réduit nos échantillons à 23 patients.

II-3-PCR/ Digestion enzymatique

Après avoir amplifié l'exon 7 du chromosome X, contrôlé les produits de PCR sur gel d'agarose à 2% et digéré le produit PCR par l'enzyme NlaIII, les résultats obtenus sont représentés et mentionnés dans les photos ci-dessous :



Figure 16 : Électrophorèse sur gel d'agarose du produit PCR du gène *TEX11* (les résultats ne sont pas visibles en raison du haut poids moléculaire de l'ADN)(M :marqueur de taille , « 1,2,3,4,5, patients »).

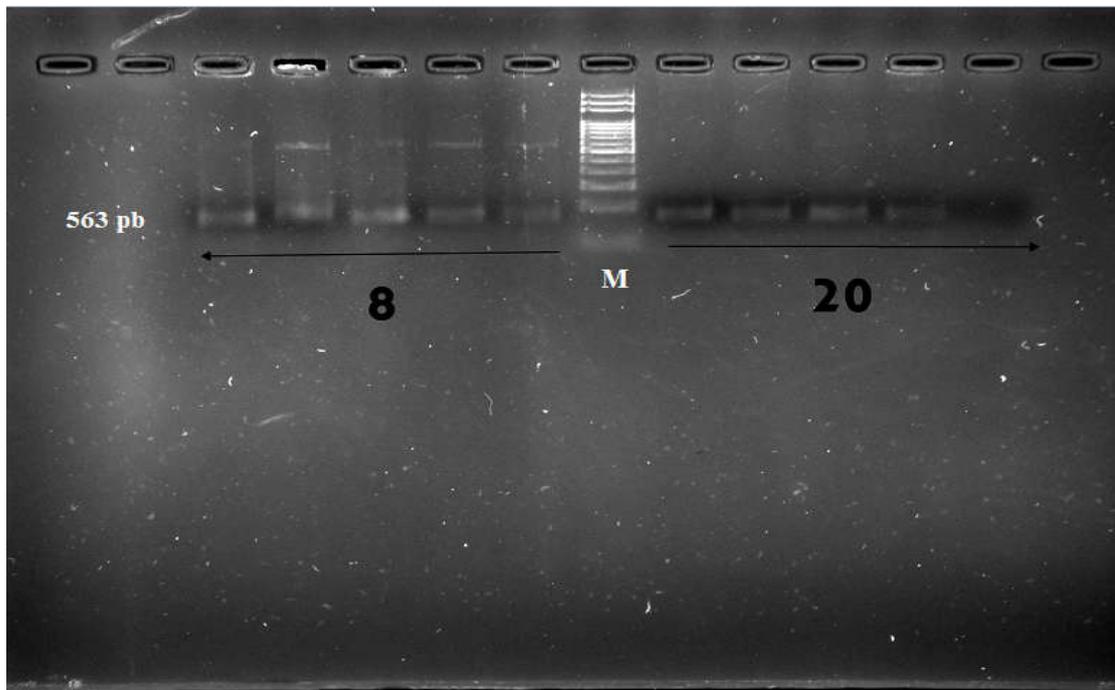


Figure 17 : Électrophorèse sur gel d'agarose, montrant le schéma d'amplification du polymorphisme du gène *TEX11*. (M:marqueur de taille).

L'analyse des échantillons par PCR a révélé la présence d'une bande de 563 pb (comme l'indique la figure) dans 8 échantillons, tandis que d'autres n'ont pas montré cette bande spécifique. Cette disparité de résultats peut être attribuée à une dégradation de l'ADN dans certains échantillons où la bande n'a pas été observée, ou un haut poids moléculaire qui ne correspondait pas aux résultats obtenus dans les mesures des concentrations d'ADN.

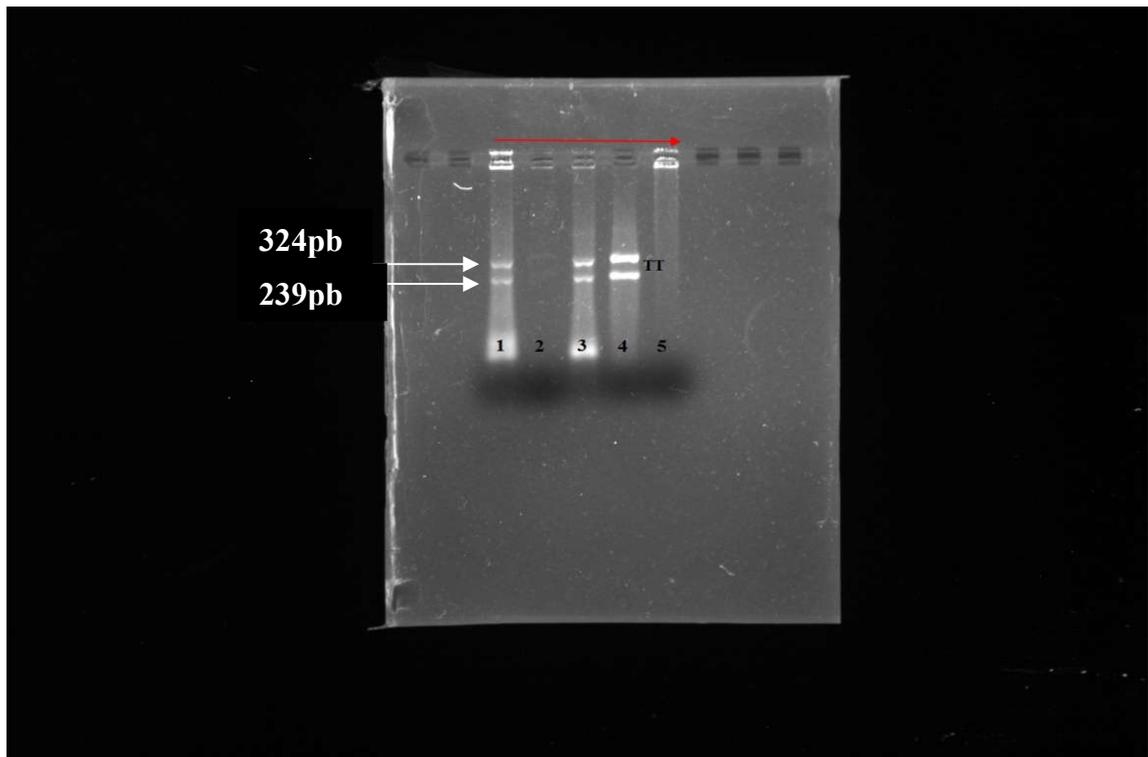


Figure 18 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus après digestion du produit de PCR du gène *TEX11* par *NlaIII*. 1,2,3,4,5 : patients

Les deux bandes représentent un profil d'un homozygote sauvage TT avec deux bandes correspondants à des fragments de tailles différentes : de 324 pb et 239 pb.

Après la lecture de la totalité des profils électrophorétique obtenus, les fréquences et les génotypes qui ont été obtenus sont :

- L'homozygote « TT » avec une fréquence de 100 %.
- L'hétérozygote « TC » avec une fréquence de 0 %.
- L'homozygote muté « CC » avec une fréquence 0 %.

Selon les résultats obtenus, il n'y a pas de mutation détecté au niveau de l'exon 7 du gène *TEX11* de polymorphisme T/C (rs143246552).

Nos résultats concordent avec ceux publiés par, Behvarz *et al.* (2022) qui ont montré qu'aucune corrélation n'avait été observée entre le polymorphisme (rs143246552) du gène

TEX11 et l'azoospermie idiopathique, mais avec une légère différence des fréquences (TT) 95%, (TC) 2%, (CC) 3%, contrairement aux résultats obtenus par Yatsenko *et al.* (2015) où une mutation d'épissage au niveau de l'exon 7 du gène *TEX11* a été trouvée. Les auteurs ont aussi indiqué qu'il y avait une association significative entre le polymorphisme (rs6525433) et l'infertilité masculine dans la population chinoise tandis qu'aucune association significative n'a été trouvée entre le polymorphisme (rs484424) de *TEX11* et l'infertilité masculine dans cette population (Zhang *et al.*, 2015).

Les recherches menées par Yang *et al.*, (2015), Sha *et al.*, (2018) et Yu *et al.*, (2021) ont mis en évidence des mutations faux-sens. Cependant, il est important de noter que cela ne signifie pas qu'il n'y a pas d'autres mutations présentes dans les autres exons de l'ADN. Par exemple, dans l'étude de Yu *et al.* (2021), une délétion de l'exon 3 a été identifiée dans le gène *TEX11* chez un patient atteint d'azoospermie, cette étude a démontré que la perturbation génique du *TEX11* est une cause d'azoospermie, comme cela a été mentionné dans nos propres recherches.

De plus, les recherches de Yang *et al.* (2015) ont révélé des altérations au niveau des introns "10, 12, 15, 20, 22, 23, 24, 27, 28". Cette constatation suggère que l'infertilité ne se limitait pas aux mutations des exons uniquement.

Ces dernières années, de nombreuses études ont été menées pour identifier les mécanismes moléculaires de l'infertilité masculine. Cependant, une grande proportion des cas d'infertilité masculine sont idiopathiques comme le sont les cas sur lesquels nous avons travaillé.

Les contradictions observées dans les résultats des différentes études peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, tels que d'autres polymorphismes de gènes impliqués qui peuvent causer l'infertilité masculine, la taille de l'échantillon, les différences génétiques entre les populations, les diversités ethniques et raciales, ainsi que les facteurs environnementaux.

Conclusion et perspectives

L'infertilité est un défi mondial croissant, affectant environ 13 à 15% des couples. La responsabilité des hommes y est impliquée dans près de la moitié des cas, ce qui est en fait un problème majeur selon la littérature et les récentes recherches. De plus, le taux d'infertilité masculine augmente de 2% par an. Elle peut être divisée en azoospermie obstructive et non obstructive, cette dernière représentant environ 60% des hommes atteints d'azoospermie. Les facteurs génétiques contribuent de 21% à 29% de l'infertilité masculine, et parmi eux, les mutations du gène *TEX11* jouent un rôle important. Ce gène est situé sur le chromosome X et est exprimé uniquement dans les cellules germinales mâles. Le *TEX11* joue un rôle important dans la spermatogenèse. Les mutations de ce gène sont diverses et présentent différentes formes, des études ont montré qu'elles sont la cause d'infertilité chez environ 1 % des hommes atteints, ce qui rendait leur identification intéressante pour déterminer les causes de l'infertilité masculine. Pour cela, notre travail d'exploration de l'étude moléculaire avait pour but d'identifier le polymorphisme du gène *TEX11* de l'exon 7 du chromosome X afin de déterminer la prévalence de cette mutation.

L'exploration moléculaire est faite par PCR/digestion enzymatique par l'enzyme NlaIII et détection des résultats sur les profils électrophorétiques, sur un échantillon de 23 patients de l'est algérien atteints d'une azoospermie. L'analyse des échantillons par PCR a révélé la présence d'une bande de 563 pb.

Les résultats de la recherche sur le polymorphisme T/C (rs143246552) du gène *TEX11* ont révélé l'absence de mutation détectée dans l'exon 7. Cependant, cela ne signifie pas que l'infertilité se limite uniquement aux mutations de cet exon, ni qu'il n'y a pas d'autres mutations présentes dans d'autres exons de l'ADN. De nombreux chercheurs ont obtenu des résultats qui démontrent une relation étroite entre les mutations de *TEX11*, l'arrêt de la méiose et l'azoospermie chez les hommes infertiles.

Une étude complète englobant l'ensemble du gène *TEX11*, sur un plus grand nombre d'échantillons, et non seulement un seul exon, serait préférable. Il serait également pertinent d'effectuer une analyse MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), une méthode moléculaire semi-quantitative basée sur une PCR multiplexe, qui permet d'identifier les délétions et les duplications d'un ou plusieurs exons.

Une autre approche consiste à réaliser un séquençage après une digestion enzymatique afin de déterminer l'ordre des nucléotides et détecter les mutations.

Jusqu'à présent, aucun traitement efficace n'a été identifié pour les cas d'azoospermie non obstructive. La découverte d'une cause génétique revêt une importance cruciale pour faciliter le diagnostic.

Il est donc recommandé de consulter un spécialiste de la fertilité ou un généticien afin d'obtenir des informations plus précises pour une évaluation et des conseils génétiques.

Références bibliographiques

- 1- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., &Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1).
- 2- Amini, L., Kahrobaie, M., Amiri-Farahani, L., &Haghani, H. (2020).The relationship between health life style and spermogram Indicators among infertile men: Preliminary data. *BMC Research Notes*, 13(1), 278.
- 3- Arafa, M., Elbardisi, H., Majzoub, A., &Agarwal, A. (Eds.).(2020). *Genetics of Male Infertility*.
- 4- Arafat, M., Har-Vardi, I., Harlev, A., Levitas, E., Zeadna, A., Abofoul-Azab, M., Parvari, R. (2017). Mutation in TDRD9 causes non-obstructive azoospermia in infertile men. *Journal of Medical Genetics*, 54(9), 633–639.
- 5- Bâali, R. & Boukeloua, A. (2020). Examen de spermogramme en cas d'infertilité masculine [Mémoire de Master, Université Larbi Ben M'hidi - Om-el-bouaghi].
- 6- Barone R. (2001). *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4: splanchnologie II. Edition Vigot Frères: 241-516.*
- 7-Barraud-Lange, V. Givelet, M. Riou, L.Wolf, J.-P. Fouchet, P.(2018). Caractérisation des cellules souches germinales et régénérescence de la spermatogenèse. *Morphologie*, 102(338), 137–138.
- 8- Behvarz, M., Rahmani, S.A., Siasi Torbati, E. et al (2022). Association of CATSPER1, SPATA16 and TEX11 genes polymorphism with idiopathic azoospermia and oligospermia risk in Iranian population. *BMC Med Genomics* 15, 47.
- 9- Bellil, H., Ghieh, F., Hermel, E., Mandon-Pepin, B., &Vialard, F. (2021). Human testis-expressed (TEX) genes: a review focused on spermatogenesis and male fertility. *Basic and Clinical Andrology*, 31(1).
- 10- Ben Rhouma, M., Okutman, O., Muller, J., Benkhalifa, M., Bahri, H., Ben Rhouma, K., Tebourbi, O, Viville, S. (2018). Aspect génétique de l'infertilité masculine : de la recherche à la clinique. *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie*.
- 11- Berger, R. (2007). *Cytogénétique humaine. De 1956 à 2006. Pathologie Biologie*, 55(1), 1-12.
- 12- Boroujeni, P. B., Sabbaghian, M., Totonchi, M., Sodeifi, N., Sarkardeh, H., Samadian, A., Sadighi-Gilani, M. A., &Gourabi, H. (2018). Expression analysis of genes encoding *TEX11*, *TEX12*, *TEX14* and *TEX15* in testis tissues of men with non-obstructive azoospermia. *JBRA assisted reproduction*, 22(3), 185–192.
- 13- Boudghène, F., & Tassart, M. (2014). *Anatomie du pelvis et de l'appareil génital masculin. IRM Du Pelvis de L'homme et de La Femme*, 15–27.
- 14- Braham, I., hocq, H., & chevalier, N (2021) . azoospermie: l'endocrinologue a-t-il un rôle a jouer? .
- 15- Brugnon, F. (2009). *Apoptose du spermatozoïde et fertilité masculine. Génétique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I. Français. ffNNT : 2009CLF1MM01ff.*
- 16- Cioppi, F., Rosta, V., & Krausz, C. (2021). Genetics of Azoospermia. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3264.
- 17- Coat, C., Perrin, A., Talagas, M., Tetefort, R., Amice, J., Valéri, A., ... Amice, V. (2011). Azoospermie : prise en charge et résultats. À propos de 90 cas. *Progrès En Urologie*, 21(13), 946–954.
- 18- Dastugue, N. (2003). Place de la cytogénétique conventionnelle et moléculaire dans l'étude des leucémies aiguës. , 51(6), 0–345.
- 19- Dimassi, S., Tilla, M., &Sanlaville, D. (2017). Anomalies chromosomiques. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 30(5-6), 249–270.

- 20- Dohle, G. R., Colpi, G. M., Hargreave, T. B., Papp, G. K., & Jungwirth, A. (2010). European Association of Urology guidelines on male infertility: the 2010 update. *European Urology*, 58(2), 175-194.
- 21- Eisenberg ML, Betts P, Herder D, Lamb DJ, Lipshultz LI. Increased risk of cancer among azoospermic men. *FertilSteril*.(2013).Sep;100(3):681-5 .
- 22- El fekih, S (2018) . Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV / ICSI et investigations génétiques des spermatozoïdes d'hommes infertiles .thèse de doctorat : Génétique, Génomique, Bioinformatique . Université de monastir (Tunisie).
- 23- El-Hamzaoui, S. A., & Dikoumba, A. (2005). Spermogramme et spermocytogramme. *Revue Française Des Laboratoires*, (369), 29–34.
- 24- Faasse, M. A., &Niederberger, C. S. (2012). Epidemiological Considerations in Male Infertility. *Male Infertility*, 131–142.
- 25- Ferlin, A., Raicu, F., Gatta, V., Zuccarello, D., Palka, G., Foresta,C. (2007). Male infertility: role of genetic background. *ReprodBiomed Online* ;14(6):734–45.
- 26- Frikh, M., Benaissa, M., Kasouati, J., Benlahlou, Y., Chokairi, O., Barkiyou, M., Chadli, M., Maleb, A., &Elouennass, M. (2021). Prévalence de l'infertilité masculine dans un hôpital universitaire au Maroc [Prevalence of male infertility in a university hospital in Morocco]. *The Pan African medical journal*, 38, 46.
- 27-Griswold,D.(2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis.*Physiological Reviews*, 96(1), 1–17.
- 28- Guichaoua,C. Geoffroy-Siraudin, V. Tassistro, R. Ghalamoun-Slaimi, J. Perrin, C. Metzler-Guillemain (2009).Chromosomes sexuels et méiose. , 37(11-12), 0–900.
- 29- Hamdi, R. (2013). Stérilité et procréation médicalement assistée. Le taux de réussite, en Algérie est proche de celui mondial. *Santé-MAG* ; 19, 75-85 .
- 30- Ho Yuen, B., Penaherrera, M., Koehn, D., Ness, L., Robinson, W.(2003) ICSI and the transmission of X-autosomal translocation: a three-generation evaluation of X;20 translocation ;18(7):1377–82 .
- 31- Hwang, K., Walters, R. C., &Lipshultz, L. I. (2011).Contemporary concepts in the evaluation and management of male infertility.*Nature ReviewsUrology*, 8(2), 86-94.
- 32- Inhorn, M. C., &Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, 21(4), 411-426.
- 33- Jarvi, K., Lo, K., Grober, E., Mak, V., Fischer, A., Grantmyre, J., ... Domes, T. (2015). CUA Guideline: The workup and management of azoospermic males. *Canadian Urological Association Journal*, 9(7-8), 229.
- 34- Jungwirth, A., Diemer, T., Kopa, Z., Krausz, C., Tournaye, H., & European Association of Urology Working Group on Male Infertility (2012). Male infertility: Position paper, clinical practice guidelines and recommendations for health professionals. *European Urology Supplements*, 11(6), 1-61.
- 35- Jurewicz, J., Hanke, W., Radwan, M., &Bonde, J. P. (2009). Environmental factors and semen quality. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 22(4), 305-329 .
- 36- Kherraf, Z.(2016). Caractérisation moléculaire et physiopathologique d'une nouvelle cause génétique de l'azoospermie non obstructive. [Thèse de doctorat , université Grenoble-Alpes].
- 37-Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tuttelmann F.(2013). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state of-the-art 2013. *Andrology* 2014; 2(1):5–19.
- 38- Krausz, C., &Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility.*Nature Reviews Urology*,15 (6), 369-384.

- 39- Larney, C., Bailey, T. L., &Koopman, P. (2014). Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry. *Development*, 141(11), 2195–2205.
- 40- Larzul, D. (1989). La PCR : principes et applications. *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée*, 4(4), 19–IN6.
- 41- Leslie, S. W., Siref, L. E., Soon-Sutton, T. L., & Khan, M. A. (2022). Male Infertility. dans *Stat Pearls*. Stat Pearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562258/>.
- 42- Marieb E.N. (1999). Anatomie et physiologie humaines 2ème édition De Boeck.université,France , 1014p
- 43- Marieb E.N. (2006). Anatomie et physiologie humaines. 6ème édition renouveau.pédagogique,France 1096p.
- 44- Mierla, D., Jardan, D., Stoian, V.(2014). Chromosomal abnormality in men with impaired spermatogenesis. *Int J Fertil Steril* ;8(1):35–42.
- 45- Miller, SA. Dykes, DD. Polesky, HF.(1988). A simple salting-out for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* ; 16 : 1215
- 46- Miyamoto, T., Minase, G., Shin, T., Ueda, H., Okada, H., & Sengoku, K. (2017). Human male infertility and its genetic causes. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2), 81–88.
- 47- Morgan, R. D., Camp, R. R., Wilson, G. G., &Xu, S. (1996). Molecular cloning and expression of NlaIII restriction-modification system in E. coli. *Gene*, 183(1-2), 215–218.
- 48- Muhindo L., Juakali S., Modia O. A., Katenga B. G. Intérêt de la biochimie du plasma séminal dans l'exploration de l'infertilité masculine. (Revue de la littérature). *KisMed* Octobre 2021, Vol 11(2) : 473-483 .
- 49- Noblanc, A., Kocer, A., & Drevet, J. R. (2012). Protection post-testiculaire des gamètes mâles contre les dommages radicalaires. *Médecine/sciences*, 28(5), 519–525. pédagogique, France : 1096p.
- 50- Pelzman, D. L., &Hwang, K. (2021). Genetic testing for men with infertility: Techniques and indications. *Translational Andrology and Urology*, 10(3), 1354-1364.
- 51- Plotton ,I ., Brosse, A., Lejeune , H. (2011). Prise en charge de l'infertilité dans le syndrome de Klinefelter. , 39(9), 0–532.
- 52- Qureshi, S., Bibi, N., Ahmed, J., & Khan, M. J. (2021). Computational screening of pathogenic non-synonymous SNPs of the human TEX11 gene and their structural and functional consequences. *Meta Gene*, 28, 100874.
- 53- Ravel, C., & Jaillard, S. (2011). La cellule de Sertoli. *Morphologie*, 95(311), 151–158.
- 54- Ravel, C., & Siffroi, J.-P. (2009). Chromosome Y et spermatogenèse. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 37(11-12), 901–907.
- 55- Ravel, C., Chantot-Bastarud, S., Cretet, J ., Roynard, P ., Sibony, M ., Maurin, N., Belaud-Rotureau, M.-A ., Berthaut, I (2011). Syndrome de Klinefelter : qualité des gamètes et spermatogenèse. , 39(9), 0–528.
- 56- Rezgoune-Chellat, Dj.(2013). Etude cytogénétique et moléculaire des infertilités masculines. [Thèse de doctorat : Génétique des pathologies humaines, Université Frères Mentouri Constantine 1].
- 57- Ross, M. T., Grafham, D. V., Coffey, A. J., Scherer, S., McLay, K., Muzny, D., ...Bird, C. P. (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, 434(7031), 325–337.
- 58- Schlosser, J., Nakib, I., Carré-Pigeon, F., & Staerman, F. (2007). Infertilité masculine: définition et physiopathologie. *Annales d'Urologie*, 41(3), 127–133.
- 59- Schlosser, J., Nakib, I., Carré-Pigeon, F., & Staerman, F. (2006). Infertilité masculine : bilan. , 40(6), 0–354.

- 60- Sha, Y., Zheng, L., Ji, Z., Mei, L., Ding, L., Lin, S., ... Li, P. (2018). A novel *TEX11* mutation induces azoospermia: a case report of infertile brothers and literature review. *BMC Medical Genetics*, 19(1).
- 61- Sigala, J. (2016). Qualité du protéome du spermatozoïde humain et infertilité. *Médecine humaine et pathologie*. Université du Droit et de la Santé - Lille II.
- 62- Sybert, V. P., & McCauley, E. (2004). Turner's Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 351(12), 1227–1238.
- 63- Tiepolo L, Zuffardi O. (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the non fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*;34(2):119–24.
- 64- Van Eecke, V. (2019). Causes de l'infertilité masculine et intérêt des FIV ICSI / IMSI. *Sciences pharmaceutiques*. 2019. ffdumas-02454560ff.
- 65- World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (5th ed.). World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>.
- 66- Wosnitzer, M., Goldstein, M., & Hardy, M. P. (2014). Review of Azoospermia. *Spermatogenesis* 4(1), e28218.
- 67- Wu, W. (2022). (Ed.). *Male Reproductive Anatomy*. doi:10.5772/intechopen.94696 .
- 68- Yatsenko, A. N., Georgiadis, A. P., Röpke, A., Berman, A. J., Jaffe, T., Olszewska, M., Tüttelmann, F. (2015). X-Linked *TEX11* Mutations, Meiotic Arrest, and Azoospermia in Infertile Men. *New England Journal of Medicine*, 372(22), 2097–2107.
- 69- Yu, X. C., Li, M. J., Cai, F. F., Yang, S. J., Liu, H. B., & Zhang, H. B. (2021). A new *TEX11* mutation causes azoospermia and testicular meiotic arrest. *Asian journal of andrology*, 23(5), 510–515.
- 70- Zang, K. D. (1984). Genetics and Cytogenetics of Klinefelter's Syndrome., 12–23.
- 71- Zegers-Hochschild, F. Adamson, G.D. de Mouzon, J. Ishihara, O. Mansour, R. Nygren, K. *et al.*, (2009) The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, *Hum Reprod* 2009;24(11):2683–7.
- 72- Zeghib, F. (2009). Les infertilités masculines : Etude cytologique et biochimique. [mémoire: biologie et physiologie animale .Université Frères Mentouri Constantine 1].
- 73- Zhang X, Ding M, Ding X, Li T, Chen H. (2015). Six polymorphisms in genes involved in DNA double-strand break repair and chromosome synapsis: association with male infertility. *Syst Biol Reprod Med*. 61(4):187–93.)

Webographie

Anonyme 1 : <https://cancer.ca/fr/cancer-information/what-is-cancer/male-sex-organs-and-reproductive-system>

Annexes

Annexe 1 : Protocole d'extraction de l'ADN

Extraction d'ADN :

Les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique et traités ensuite par un détergent (SDS) et une protéinase K.

- L'ADN nucléaire est 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 éthanol.
- L'ADN est solubilisé en phase aqueuse par le rapport de la DO à 260 nm (logueur d'onde d'absorption des protéines) qui doit être compris entre 1.8 à 2.

Réactifs :

- TE: Tris EDTA (20 :5).
- TE 10 :1.
- Tampon de Lyse (NaCl 400mM, EDTA 2mM, Tris 10 mM, pH 8.2).
- SDS à 10 %.
- Protéinase K à 10mg/ml.
- NaCl 4M.
- Éthanol à 70%.
- Éthanol absolu.
- Consommable :
- Tube Falcon 50ml.
- Tube Falcon 15 ml.
- Pastille Stérile.
- Procédure

Préparation des leucocytes :

1. Dans un tube Falcon 50ml, mettre le sang.
 2. Compléter à 25 ml avec Tris EDTA (20 :5), pour la lyse des GR.
 3. Agitation manuel (forte agitation).
 4. Laisser 10 min dans la glace.
 5. Centrifuger 10 min à 3900g (3800 rpm).
 6. Aspirer le surnageant avec la trompe à vide.
 7. Ajouter quelques ml de TE (20 :5) au culot et le remettre en suspension avec une pastille stérile.
 8. Compléter à 25 ml avec du TE (20 :5) et laisser 10 min dans la glace.
 9. Centrifuger dans les mêmes conditions que la première fois.
 10. Aspirer le surnageant avec la trompe à vide : Obtention d'un culot des leucocytes.
(Si on veut s'arrêter à ce niveau les mettre dans un tube nue de 1.5 ml avec du TE 10:1 et les conserver à -20 dans le frigo).
- **Extraire l'ADN :**
 11. Transvaser le culot de leucocytes dans un tube Falcon 15 ml.
 12. Ajouter 3 ml de tampon de lyse en dilacérant le culot avec une palette stérile.
 13. Ajouter 200 µl de SDS à 10 %.

14. Ajouter 100 μ l de protéinase K à 10mg/ml.
15. Agiter le tube sur une roue à 37°C une nuit. Incubation une nuit.
16. Le lendemain refroidir dans la glace.
17. Ajouter 1ml de NaCl 4M et agiter vigoureusement à la main.
18. Remettre 5 min dans la glace (précipitation des protéines).
19. Centrifuger 15 min à 2500 rpm.
20. Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 15 ml, ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi (environ 8 ml) et agiter en retournant le tube plusieurs fois : la pelote d'ADN se forme.
21. Si la pelote d'ADN ne se forme pas, laisser éventuellement 30 min à -20°C.
22. Récupérer la pelote d'ADN avec une pipette pasteur et la rincer 02 fois dans éthanol à 70%.
23. Mettre la pelote d'ADN dans un tube nue.

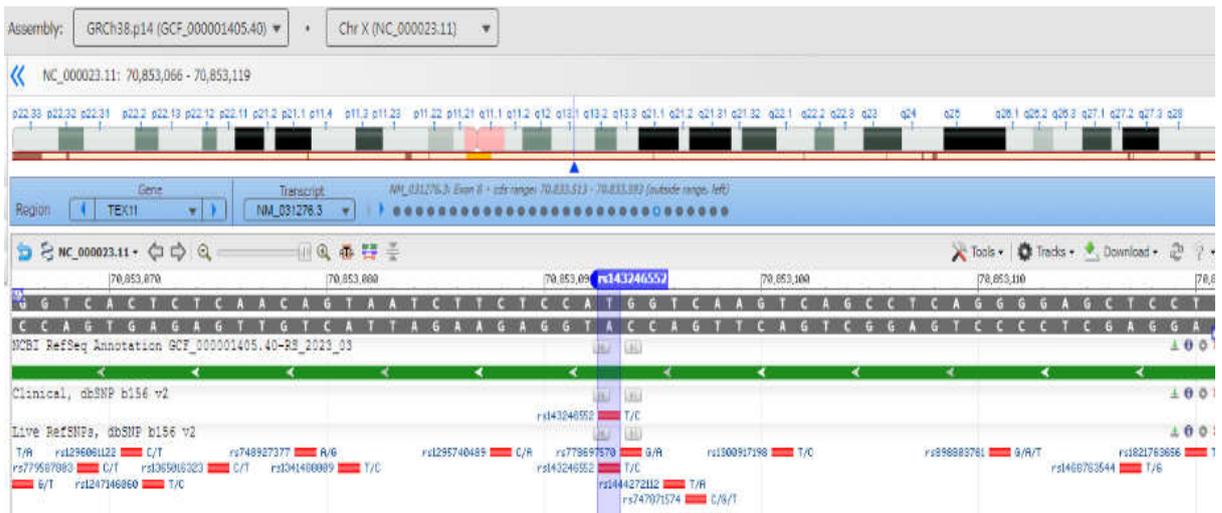
Solubilisation d'ADN :

24. Ajouter entre 300 et 1000 μ l de TE (10 :1) selon la grosseur de la pelote d'ADN et la concentration souhaitée.
25. Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

Mesure de la concentration de l'ADN :

Pour confirmer la concentration et la pureté de l'ADN, nous avons utilisé le NanoDrop® (Thermo Scientific Nanodrop® 2000/2000c) qui est un spectrophotomètre à UV. Cet appareil permet de déterminer la pureté de notre ADN, on considère que : l'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = DO_{260}/280$ est compris entre 1,6 et 2 ($1,6 < R \leq 2$), l'ADN est contaminé par les protéines si $R < 1,6$ et que l'ADN est contaminé par les ARN si $R > 2$.

Annexe 2 : Position du rs (143246552) dans l'exon 7 du gène *TEX11*



Annexe 3 : Composants du mélange réactionnel de PCR pour l'amplification de la région d'intérêt.

Réactif	Concentration
Eau distillée (H ₂ O)	
dNTP	0.2mM
Buffer	1X
MgCl ₂	2.5Mm
Taq polymérase	2 unités
Amorce F (sens)	0.3Um
Amorce R (anti -sens)	0.3Um
ADN	50ng/ul
Total	20ul

Annexe 6 : Préparation du TBE 10X et 1X

1. TBE 10X :

- Tris 108 g
- Acide borique 55 g
- Ajuster le PH à 8,3 avec l'acide acétique glacial
- EDTA 9.3 g
- QSP H₂O pour 1L

2. TBE 1X :

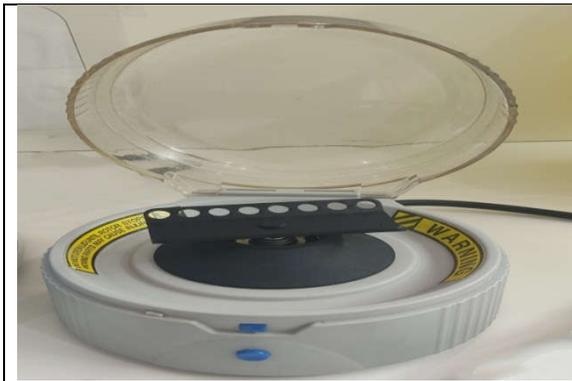
- 100 ml de TBE 10X
- 900 ml H₂O

Annexe 7 : Composants du mélange de la digestion

Mix	Vol (µl)/tube de digestion
Produit de PCR	8µl
H ₂ O	3.2 µl
Tampon enzyme 10X	1.3 µl
Enzyme de restriction NlaIII	0.5 µl

Annexes 8 : Matériels utilisés pour la PCR et l'électrophorèse

Matériel	Nom du matériel
 A white Bio-Rad C1000 Thermal Cycler with two sample blocks and a digital display showing a PCR protocol.	Thermocycleur
 A white Bio-Rad Transilluminator with a large viewing window and a control panel on the right side.	Transilluminateur
 A white Ohaus precision balance with a stainless steel weighing pan and a digital display showing 0.0000.	Balance de précision
 A Consort 5000 power supply unit with a digital display showing 01:00h, 95mA, and 7W, and several output terminals.	Générateur



Microcentrifugeuse



Cuve horizontale



Micro-onde

Résumés

Résumé

Contexte : L'infertilité masculine est un problème majeur de santé publique qui représente environ 15%. La plupart des cas ont des causes multifactorielles, plusieurs gènes ont été associés à ce problème de santé. Parmi ces gènes, le gène *TEX11*, situé sur le chromosome X.

Objectifs : L'objectif de cette étude est d'identifier polymorphisme du gène *TEX11* de l'exon 7 du chromosome X afin de déterminer la prévalence de cette mutation.

Patients et méthodes : 23 patients de l'est algérien souffrant d'azoospermie non obstructive (ANO) sur 25 patients recrutés au laboratoire de diagnostic génétique du Centre de recherche en biotechnologie (CRBt), ont subi une analyse cytogénétique par banding R, une analyse moléculaire des microdélétions AZF, ainsi que le génotypage du polymorphisme du gène *TEX11* par une étude moléculaire PCR/digestion enzymatique par l'enzyme NlaIII.

Résultats : le caryotype fait en premier pour tous nos patients était normal (46, XY). Il a été suivi de la recherche du polymorphisme où il y avait une prédominance du génotype sauvage (TT) chez les patients diagnostiqués.

Conclusion : Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats et explorer davantage le rôle du gène *TEX11* dans l'infertilité masculine. Ces résultats peuvent éventuellement contribuer à l'amélioration du diagnostic et de la prise en charge des patients souffrant de cette pathologie.

Mots clés : infertilité masculine, azoospermie non obstructive, gène *TEX11*, réaction en chaîne polymérase, génotypage.

Abstract

Context: Male infertility is a major public health issue, accounting for approximately 15% of cases, and most cases have multifactorial causes. Several genes have been associated with this health problem, including the *TEX11* gene located on the X chromosome.

Objectives: The objective of this study is to identify the polymorphism of the *TEX11* gene exon 7 on the X chromosome in order to determine the prevalence of this mutation.

Patients and Methods: 23 patients from eastern Algeria suffering from non-obstructive azoospermia (ANO) out of the 25 patients recruited at the Genetic Diagnostic Laboratory of the Biotechnology Research Center (CRBt) underwent cytogenetic analysis using R-banding, molecular analysis of AZF microdeletions, and genotyping of the *TEX11* gene polymorphism using PCR and enzymatic digestion with the NlaIII enzyme.

Results: The first performed karyotype for all our patients was normal (46, XY). It was followed by the investigation of polymorphism where there was a predominance of the wild-type genotype (TT) among the diagnosed patients.

Conclusion: Further research is required to confirm these results and further explore the role of the *TEX11* gene in male infertility. These findings may potentially contribute to improving the diagnosis and management of patients with this pathology.

Keywords: male infertility, non-obstructive azoospermia, *TEX11* gene, polymerase chain reaction, genotyping.

الملخص

السياق: يعد العقم عند الذكور مشكلة صحية عامة و رئيسية تمثل حوالي 15%، كما أن معظم الحالات لها أسباب متعددة العوامل, هناك عدة جينات مرتبطة بهذه المشكلة الصحية من بينهم الجين *TEX11* الموجود على مستوى الصبغي X .

الأهداف: الهدف من هذه الدراسة هو تحديد التعدد الجيني لجين *TEX11* على مستوى القطعة الدالة رقم 7 للصبغي X لتحديد انتشار هذه الطفرة الجينية .

المرضى و الطرق : 23 مريضاً من شرق الجزائر يعانون من فقد النطاف اللانسدادي (ANO) من بين 25 مريضاً تم انتقاؤهم في مختبر التشخيص الجيني التابع لمركز البحث في البيوتكنولوجيا (CRBt) خضعوا لتحليل سايتوجيني بواسطة الشريطة R وتحليل جزيئي للحذف الدقيق لمناطق الجين *AZF* بالإضافة إلى تحديد التعدد الجيني لتغير جين *TEX11* بواسطة دراسة جزيئية بتقنية PCR/الهضم الانزيمي عن طريق انزيم NlaIII .

النتائج: أظهرت الدراسة الأولية للكاربوتايب لجميع مرضانا نتائج طبيعية (46,XY) تبع ذلك البحث في التشابهات الجينية حيث تم الاكتشاف أن النمط الوراثي الطبيعي (TT) هو الأكثر انتشاراً بين المرضى المشخصين. **الاستنتاج:** هناك حاجة إلى بحوث إضافية لتأكيد هذه النتائج واستكشاف دور جين *TEX11* في العقم الذكوري, قد تساهم هذه النتائج في تحسين التشخيص ورعاية المرضى الذين يعانون من هذه الحالة.

الكلمات المفتاحية : العقم الذكوري، العقم اللانسدادي، جين *TEX11*, تفاعل البلمرة المتسلسلة , التعدد الجيني.

Année universitaire : 2022-2023	Présenté par : DJEGHIM Malak TERKI Maïssa
<p align="center">Étude moléculaire du gène <i>TEX11</i> dans les infertilités masculines idiopathiques (Azoospermie) dans un échantillon de patients de l'est algérien</p>	
<p align="center">Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique</p>	
<p>Résumé</p> <p>Contexte : L'infertilité masculine est un problème majeur de santé publique qui représente environ 15%. La plupart des cas ont des causes multifactorielles, plusieurs gènes ayant été associés à ce problème de santé. Parmi ces gènes, le gène <i>TEX11</i>, situé sur le chromosome X.</p> <p>Objectifs : L'objectif de cette étude est d'identifier polymorphisme du gène <i>TEX11</i> de l'exon 7 du chromosome X afin de déterminer la prévalence de cette mutation.</p> <p>Patients et méthodes : 23 patients de l'est algérien souffrant d'azoospermie non obstructive (ANO) sur 25 patients recrutés au laboratoire de diagnostic génétique du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt), ont subi une analyse cytogénétique par banding R, une analyse moléculaire des microdélétions AZF, ainsi que le génotypage du polymorphisme du gène <i>TEX11</i> par une étude moléculaire PCR/digestion enzymatique par l'enzyme NlaIII.</p> <p>Résultats : Le caryotype fait en premier pour tous nos patients était normal (46, XY). Il a été suivi de la recherche du polymorphisme où il y avait une prédominance du génotype sauvage (TT) chez les patients diagnostiqués.</p> <p>Conclusion : Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats et explorer davantage le rôle du gène <i>TEX11</i> dans l'infertilité masculine. Ces résultats peuvent éventuellement contribuer à l'amélioration du diagnostic et de la prise en charge des patients souffrant de cette pathologie.</p>	
<p>Mots clés : infertilité masculine, azoospermie non obstructive, gène <i>TEX11</i>, réaction en chaîne polymérase, génotypage.</p>	
<p>Laboratoire de recherche : Laboratoire de diagnostic génétique et plateforme microscopie du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt).</p>	
<p>Jury d'évaluation :</p> <ul style="list-style-type: none"> •Présidente : BENHIZIA Hayet (MCA. Université Frères Mentouri Constantine 1). •Encadrants : BECHKRI Sakina (MCA. Université Frères Mentouri Constantine 1). NINI Anissa (Ingénieur principale .Centre de Recherche en Biotechnologie). •Examinatrice: BOUDOKHANE Ibtissem (MCB. Université Frères Mentouri Constantine 1). 	
<p align="center">Soutenu le mardi 20-06-2023</p>	

