

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE BATNA 2 MUSTAPHA BEN BOULAIID  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de  
Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle

**Filière :** Sciences Biologiques

**Option :** Biotechnologie des Molécules Bioactives et Pathologies Moléculaires

**Présentée par :** Bousnane Nour El Houda

**Thème**

**Diagnostic, physiopathologie, implication du stress oxydatif et génétique de  
l'infertilité masculine chez une partie de la population Algérienne**

**Jury**

<b>Président</b>	<b>Pr. Laroui Salah</b>	<b>Université Batna 2</b>
<b>Directeur de Thèse</b>	<b>Pr. Yahia Mouloud</b>	<b>Université Batna 2</b>
<b>Examinatrice</b>	<b>Pr. Naimi Dalila</b>	<b>Ecole nationale supérieure de Biotechnologie Toufik Khaznadar (ENSB) Constantine</b>
<b>Examinatrice</b>	<b>Pr. Satta Dalila</b>	<b>Université Mentouri Constantine</b>
<b>Examineur</b>	<b>Pr. Rouabhia Samir</b>	<b>CHU Batna-université Batna 2</b>
<b>Invitée</b>	<b>Pr. Hambaba Leila</b>	<b>Université Batna 2</b>

**Année universitaire 2017-2018**

## *Remerciements*

**A Monsieur le Professeur, Yahia Mouloud, de l'université Batna 2**, qui m'a fait l'honneur d'accepter l'encadrement de cette thèse, de m'aider et de me conseiller tout au long de ce travail. Merci pour le temps que vous m'avez consacré, merci pour votre cofinance, votre patience et votre disponibilité. Veuillez accepter ma profonde reconnaissance et respect.

**A Monsieur le Professeur, Laroui Salah, de l'université Batna 2**, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Hommages respectueux.

**A Madame le Professeur, Naimi Dalila, de l'école nationale supérieure de Biotechnologie (ENSB), Constantine. A Madame le Professeur, Satta Dalila de l'université Mentouri, Constantine**, qui nous ont fait l'honneur de participer, en tant qu'examinatrices, à notre jury de thèse. Sincères remerciements.

**A Monsieur le Professeur, Rouabhia Samir, du centre hospitalo-universitaire de Batna**, qui nous a fait l'honneur d'examiner cette thèse. Hommages respectueux.

**A Madame le Professeur, Hambaba Leila, de l'université Batna 2**, qui nous a honoré avec sa présence en tant qu'invitée, veuillez accepter ma profonde reconnaissance.

**A Madame le Professeur May Sadiq, de l'université Elyarmouk, Jordanie**, Vous êtes un puits de savoir et une rivière de générosité, je vous remercie pour votre disponibilité. Les trois mois passés au niveau de votre laboratoire m'ont permis d'acquérir la rigueur indispensable à tout travail de recherche et d'apprendre le sens de l'analyse. Recevez ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

**A Monsieur abdelkarim Abu Al haija, de l'université Elyarmouk, Jordanie**. C'était un plaisir de travailler avec vous Mr, malgré votre jeune âge, vous êtes une encyclopédie de biologie moléculaire, jamais de problèmes sans solutions et jamais le temps de s'ennuyer a votre compagnie au laboratoire. Je vous suis sincèrement reconnaissante.

Un remerciement particulier à l'équipe du centre de recherche en Biotechnologie de Constantine, spécialement **Dr Smadi Adnane**.

**A PAPA, A MAMAN, DES PARENTS PAS COMME LES AUTRES.** Grâce à qui je suis là aujourd'hui. Vous m'avez tant supporté et me merveilleusement accompagné pendant toute la période de la réalisation de ma thèse, sans vous je ne vaudrais absolument rien. Vous avez toujours cru en moi et soutenu dans les moments les plus difficiles. Quelques lignes ne suffiraient pas à faire une longue et belle phrase digne de vous alors juste **MERCI. MERCI MON ROI, MERCI MA REINE.** «**MERCI MES SPONSORS DE THESE** 😊😊 ».

A mes sœurs, Wassila et Maroua, à mon petit frère Yahia Mohamed Yassine, vous avez tous contribué à votre manière à cette réussite, merci pour votre patience et encouragements. Je vous aime mon équipe ! A ma tante Djamila, ton amour inconditionnel et ta présence ont énormément compté pour moi. Je ne te remercierais jamais assez.

**A mon Mari Salah Eddine,** Parce que ça fait du bien d'avoir des personnes sur lesquelles on peut compter. Tu me rends plus forte, tu me garde toujours les repères. J'aime tant notre complicité. Cette thèse est synonyme du début de notre vie ; dans notre chez nous. En espérant qu'on puisse enfin réaliser nos projets et arrêter les kilomètres.

A mon amie et collègue Housna, avec qui j'ai partagé tous les hauts et les bas de ce parcours, merci pour ton soutien. A mes amies d'enfance, Abir, Amina, Iman et Nihad dont l'amitié est restée infaillible malgré nos situations éloignées, merci pour vos encouragements.

A mon collègue Chennef Ali, à tous les médecins, pharmaciens et biologistes du CHU de Batna, des laboratoires Elfarabi, Gouaraf et de la clinique les cèdres, sans vous mon travail n'aurait jamais vu le jour. Mille MERCI.

**Dr Ayache,** merci pour ce que tu m'as transmis et pour ta gentillesse. **Dr Ouadfel,** vous m'avez donné le coup de départ, vous étiez mon repère, Mille merci. **Dr Gouaraf** et **Dr Otmani** Merci de m'avoir accueilli généreusement au sein de vos laboratoires et de me permettre de travailler dans les meilleures conditions possibles. **Dr Touil,** merci pour votre accueil au sein du service d'histologie et pour tous les conseils précieux. **Dr Zogmar,** Merci pour votre généreuse aide. **Mr Rachid,** Mille merci pour ta présence et ton soutien.

*Pour finir, cette thèse je la dédie à la mémoire de ma grand mère partis trop tôt... que dieu l'accueille dans son vaste paradis.*

## Table des matières

Remerciement	
Table des matières	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	
<b>Partie 1 : Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre I: L'infertilité masculine: notions et concepts fondamentaux</b>	
I.1. Définition et épidémiologie de l'infertilité masculine.....	01
I.2. Etiologie de l'infertilité masculine.....	02
I.2.1. Causes près testiculaires.....	02
I.2.1.1. Hypogonadisme hypergonadotrope.....	03
I.2.1.2. Hypogonadisme hypogonadotrope .....	04
I.2.2. Causes testiculaires.....	05
I.2.2.1. L'origine cytogénétique et génétique.....	05
I.2.2.2. L'origine de cancers et de traitements anticancéreux.....	06
I.2.2.3. L'origine malformatives.....	07
I.2.2.4. L'origine vasculaire (varicocèle).....	07
I.2.3. Causes post testiculaires.....	08
I.2.3.1. Absence bilatéral congénital des canaux déférents (ABCD).....	08
I.2.3.2. Les infections.....	09
I.2.3.3. Les dysfonctions sexuelles.....	10
I.2.4. Infertilité masculine idiopathique.....	11
I.3. Exploration de l'homme infertile.....	12
I.3.1. Bilan Clinique initial.....	12
I.3.1.1. Interrogatoire.....	12
I.3.1.2. Examen physique.....	13
I.3.2. Examens complémentaires de première intention.....	13
I.3.2.1. Spermogramme.....	13
I.3.2.2. Spermocytogramme .....	14
I.3.2.3. Test postcoïtal de Hühner .....	15
I.3.2.4. Test de migration-survie.....	15
I.3.3. Examens complémentaires de seconde intention .....	15

I.3.3.1. Spermoculture.....	15
I.3.3.2. Bilan hormonale.....	16
I.3.3.3. Analyse postéjaculatoire des urines.....	16
I.3.3.4. Bilan d'auto-immunisation anti spermatozoïde.....	17
I.3.3.5. Bilan radiologique.....	17
I.3.3.7. Etudes cytogénétiques et génétiques.....	17
I.3.3.8. Biochimie du sperme .....	18
I.4. Anomalies du sperme.....	19

## **Chapitre II: Stress oxydatif et infertilité masculine**

II.1. Définition du stress oxydatif.....	21
II.2. Les espèces réactives à l'oxygène.....	22
II.3. Les mécanismes de défenses antioxydantes.....	23
II.3.1. Le système de défense enzymatique.....	24
II.3.1.1. Le superoxyde dismutase .....	24
II.3.1.2. Le glutathion peroxydase.....	26
II.3.1.3. La catalase.....	27
II.3.2. Le système de défense non-enzymatique.....	29
II.3.2.1. La vitamine E.....	29
II.3.2.2. La vitamine C.....	29
II.3.2.3. La vitamine A.....	30
II.3.2.4. La carnitine .....	30
II.3.2.5. Le zinc .....	30
II.4. Implication du stress oxydatif dans la physiologie et la physiopathologie de l'infertilité masculine.....	31
II.4.1. Rôle physiologique des ERO dans la fertilité de l'homme.....	31
II.4.2. Effets pathologiques délétères ERO sur la fertilité masculine.....	33
II.5. Etiologie du stress oxydatif séminal et origine des ERO.....	36
II.5.1. Sources endogène des ERO.....	36
II.5.2. Sources exogènes des ERO.....	37
II.6. Marqueurs biologiques su stress oxydatif et leurs mesures dans le plasma séminal.....	39
II.7. Polymorphisme des gènes antioxydants et infertilité masculine.....	42

## **Partie 2 : Travail expérimental**

### **Chapitre I: Matériel et Méthodes**

I.1. Présentation et objectifs de l'étude.....	45
I.2. Recrutement des malades et des témoins.....	47

I.2.1. Critères d'inclusion .....	47
I.2.2. Critères d'exclusion.....	47
I.3. Recueil du sperme et examens spermio­logiques.....	50
I.3.1. spermogramme.....	50
I.3.2. Spermocytogramme.....	52
I.4. Dosages hormonaux.....	53
I.5. Etude du statut oxydatif du plasma sémi­nal.....	54
I.5.1. Mesure de l'activité de Superoxyde dismutase.....	54
I.5.2. Mesure de l'activité de Glutathion peroxydase.....	55
I.5.3. Mesure de l'activité de la Catalase.....	56
I.5.4. Dosage du malondialdéhyde.....	57
I.6. Evaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique.....	58
I.7. Etude moléculaire.....	59
I.7.1 Extraction de l'ADN à partir du sang total.....	59
I.7.2. Screening des microdélétions du chromosome Y.....	60
I.7.3 Analyse du polymorphisme <i>CAT-262C/T</i> .....	64
I.7.4 Analyse du polymorphisme <i>SOD3 362G/A</i> .....	65
I.8. Analyse statistique.....	66
<b>Chapitre II : Résultats et discussion</b>	
II.1. Caractéristiques générales de la population étudiée.....	68
II.2. Résultats de l'étude cyto-spermio­logique et fragmentation de l'ADN spermatique.....	70
II.3. Résultats de l'étude des profils hormonaux.....	73
II.4. Résultats de l'évaluation du statut oxydatif sémi­nal.....	76
II.5. Résultats de l'étude des associations entre le statut oxydatif sémi­nal, les paramètres spermio­logiques et la fragmentation de l'ADN spermatique.....	84
II.6. Résultats de l'étude moléculaire.....	87
II.6.1. Résultats du screening des microdélétions du chromosome Y.....	87
II.6.2. Résultats de l'étude des polymorphismes génétiques.....	89
II.6.2.1. Résultats de l'étude du polymorphisme <i>CAT-262C/T</i> (rs1001179).....	89
II.6.2.2. Résultats de l'étude du polymorphisme <i>SOD3 362G/A</i> (rs77 2536512).....	91
II.7. Résultats de l'étude de l'association entre génotypes activités sémi­nales.....	93
II.7.1. Résultats de l'étude de l'association entre les génotypes de <i>SOD3 362A/G</i> et l'activité sémi­nale SOD.....	93
II.7.2. Résultats de l'étude de l'association entre les génotypes de <i>CAT-262C/T</i> (rs1001179) et l'activité sémi­nale <i>CAT</i> .....	95

<b>Conclusion .....</b>	<b>97</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>99</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>125</b>

## Liste des abréviations

**${}_1\text{O}^2$**  : Oxygène singulier.

**8-oxoDG**: 8-Hydroxydeoxyguanosine.

**ABCD** : Agénésie congénitale bilatérale des canaux déférents.

**AC** : Adénylate cyclase.

**AGPI** : Acides gras poly –insaturés.

**AMP** : Assistance médicale à la procréation.

**AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique.

**AP-1** : Protéine activatrice 1.

**ASA** : anticorps anti-spermatozoïdes.

**ATB** : Acide Thiobarbiturique.

**ATP** : Adénosine triphosphate.

**AZF** : Azoospermea factor.

**CAG** : Capacité antioxydante globale.

**CAM** : Complexe d'attaque membranaire.

**CAT** : Le gène catalase.

**CAT**: L'enzyme catalase.

**CATSPER** : Canaux cationiques spécifiques au sperme.

**CFTR** : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

**CS** : Cellules de Sertoli.

**Cu** : Cuivre.

**DAO** : Dérivés actifs de l'oxygène.

**DEFB** : Beta défensine.

**DFI** : Indice de fragmentation d'ADN.

**DHA**: Acide docosahexaénoïque.

**ECR** : Excès de cytoplasme résiduel.

**EC-SOD** : Superoxyde dismutase extracellulaires.

**ERO** : Espèces réactives à l'oxygène.

**FIV** : Fécondation in vitro.

**FSH** : Hormone folliculo-stimulante.

**GnRH** : Gonadotropin Releasing Hormone.

**GPX** : Glutathion peroxydase.

**GR** : Glutathion réductase.

**GSH** : Glutathion réduit.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène.

**HH** : Hypogonadisme hypogonadotrope.

**HOCL** : Acide hypochloreux.

**HOO-** : Radical hydroperoxydes.

**HPV** : Virus de papilloma humain

**HSV** : Virus de l'herpès simplex.

**I.N.T** : Acide 2- (4-iodophényl) -3- (4-nitrophényl) -5-phényl tétrazolium.

**ICSI** : Injection intracytoplasmique du spermatozoïde.

**IL-6** : Interleukine 6.

**IL-8** : Interleukine 8.

**IMC** : Indice de masse corporelle.

**ITP** : Insuffisance testiculaire primaire.

**LAC** : L acétylcarnitine.

**LC** : L carnitine.

**LH** : Hormone lutéinisante.

**MDA** : Malondialdéhyde.

**MEK** : Extracellular signal regulated kinases.

**NADP** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

**NF- $\kappa$ B** : Nuclear Factor-Kb.

**NO•** : Oxyde nitrique.

**O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>** : L'anion superoxyde.

**OAT** : Oligo-astheno-tératozoospermie.

**OH•** : Le radical hydroxyle.

**PBS** : Tampon phosphate salin.

**PCR** : Réaction de polymérisation en chaîne.

**PKA** : Protéine kinase A.

**PKC** : Protéine kinase C.

**PLA<sub>2</sub>** : Phospholipase A<sub>2</sub>.

**PNN** : Polynucléaires neutrophiles.

**PTK** : Protéines tyrosines kinases.

**PTP** : Protéines tyrosines phosphatases.

**R** : Radicaux alkyle.

**RFLP** : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

**RO•** : Radical alcoxyle.

**ROO•** : Radical peroxyde.

**ROOH** : peroxydes d'alkyle.

**RPE** : Résonance para électronique.

**Sec** : Sélénocystéine.

**SH** : Sulfhydryle.

**snGPX4** : Sperm nucleus glutathione peroxidase.

**SNP** : Polymorphisme de simple nucléotide.

**SO** : Stress oxydatif.

**SOD** : L'enzyme superoxyde dismutase.

*SOD* : Le gène superoxyde dismutase.

**Spz** : Spermatozoïde.

**STS** : Sequence tagged site.

**TAC**: Capacité antioxydante totale.

**TNF** : Tumor necrosis factor.

**TRABS** : Thiobarbituric acide reactant substances.

**UFC** : Unité formant colonie.

**VEGF** : Vascular endothelial growth factor.

**VIH** : Virus d'immunodéficience humaine.

**Zn** : zinc.

**ZP** : zone pellucide.

**β HCG** : beta human chorionic gonadotropin.

## Liste des Figures

<b>Figure 01</b> : Interactions entre les principaux antioxydants impliqués dans la spermatogenèse.....	28
<b>Figure 02</b> : Représentation simplifiée des voies de signalisations affectées par les ERO.....	33
<b>Figure 03</b> : Rôle du stress oxydatif dans la fertilité masculine .....	35
<b>Figure 04</b> : Résumé de l'équilibre entre la production d'ERO et les systèmes antioxydants.....	39
<b>Figure 05</b> : Diagramme montrant les différentes méthodes de mesure du stress oxydatif séminal .....	42
<b>Figure 06</b> : Courbe d'étalonnage de SOD.....	55
<b>Figure 07</b> : Schématisation des principaux STS des régions AZF a, b et c.....	61
<b>Figure 08</b> : Représentation schématique du protocole d'analyse des microdélétions du chromosome Y....	61
<b>Figure 09</b> : Tableaux notant l'absence/présence de chaque STS pour tous les échantillons testés.....	63
<b>Figure 10</b> : Distribution des sujets infertiles selon les cas pathologiques de spermogramme et de spermocytogramme.....	73
<b>Figure 11</b> : Comparaison des taux de FSH entre les sujets infertiles et les témoins.....	75
<b>Figure 12</b> : Comparaison des taux de LH entre les sujets infertiles et les témoins.....	75
<b>Figure 13</b> : Comparaison des taux de Testostérone entre les sujets infertiles et les témoins .....	76
<b>Figure 14</b> : Comparaison des taux de prolactine entre les sujets infertiles et les témoins.....	76
<b>Figure 15</b> : Activité enzymatique séminale de SOD des sous groupes infertiles.....	78
<b>Figure 16</b> : Activité enzymatique séminale de GPX des sous groupes infertiles.....	79
<b>Figure 17</b> : Activité enzymatique séminale de CAT des sous groupes infertiles.....	80
<b>Figure 18</b> : Concentrations séminales de MDA des sous groupes infertiles.....	81
<b>Figure19</b> : Photographie du profil électrophorétique d'un témoin et d'un patient azoosperme avec des délétions au niveau des régions AZF b et AZFc.....	87
<b>Figure20</b> : Photographie d'un gel d'électrophorèse représentatif des résultats du génotypage de CAT-262C/T.....	90

<b>Figure 21 :</b> Photographie d'un gel d'électrophorèse représentatif des résultats de génotypage de SOD3 362G/A.....	91
<b>Figure 22 :</b> Histogramme montrant les activités séminales de SOD chez des cas porteurs de différents génotypes <i>SOD</i> 362A/G.....	93
<b>Figure 23 :</b> Histogramme montrant les activités séminales de SOD chez des cas porteurs de différents génotypes <i>CAT</i> -262C/T.....	95

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Limites inférieure de référence pour les caractéristiques du sperme.....	14
<b>Tableau 02:</b> Anomalies spermiologiques selon les critères de l'OMS 2010.....	20
<b>Tableau 03 :</b> Quelques exemples de radicaux libres .....	23
<b>Tableau 04 :</b> Antioxydants enzymatiques majeurs impliqués dans la spermatogenèse .....	28
<b>Tableau 05 :</b> Raisons d'exclusion des cas infertiles et des témoins fertiles pour notre étude.....	49
<b>Tableau 06 :</b> Procédure de dosage de la catalase.....	57
<b>Tableau 07 :</b> Composition de mix PCR pour le screening des microdélétions du chromosomeY...	62
<b>Tableau 08 :</b> Conditions de la PCR multiplexe .....	62
<b>Tableau 09 :</b> Sondes utilisées pour le génotypage de CAT-262C/T.....	64
<b>Tableau 10:</b> Composition du mix PCR Pour le génotypage de CAT-262C/T.....	64
<b>Tableau 11 :</b> Conditions de la PCR Pour le génotypage de CAT-262C/T.....	64
<b>Tableau 12 :</b> Composition du mix PCR pour le génotypage de SOD3 362G/A.....	65
<b>Tableau 13 :</b> Conditions de la PCR pour le génotypage de SOD3 362G/A.....	66
<b>Tableau 14 :</b> Génotypes et longueurs de fragments obtenues après digestion enzymatique avec BSSHII.....	66
<b>Tableau 15 :</b> Caractéristiques générales de la population étudiée.....	69
<b>Tableau 16 :</b> Caractéristiques spermiologiques des sujets malades et des témoins.....	70
<b>Tableau 17.</b> Activités séminales des enzymes antioxydantes et du MDA des cas et des témoins...	76
<b>Tableau 18.</b> Corrélations entre les concentrations en CAT, SOD, GPX et le contenu du MDA avec les paramètres spermiologiques et la fragmentation d'ADN.....	84
<b>Tableau 19.</b> Résultats des fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme CAT-262C/T chez les sujets infertiles et les témoins fertile .....	91
<b>Tableau 20.</b> Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme SOD3G362A, (rs 77 2536512) et leurs associations avec l'infertilité masculine.....	93

## Introduction

L'infertilité est un syndrome polygénique et multifactoriel, définit par l'OMS comme l'incapacité à obtenir une grossesse malgré une activité sexuelle régulière durant plus d'un an sans contraception (OMS 2010). Environ 15% des couples essayant d'obtenir une grossesse sont affectés par l'infertilité (Ferlin *et al.*, 2006 ; Trussell 2013), dans près de la moitié de ces cas l'homme est la cause (Sharlip *et al.*, 2002 ; OMS 2010).

Au cours des dernières décennies, une détérioration de la fonction de reproduction mâle a été rapportée dans de nombreuses espèces (Eustache 2011). Chez l'homme, elle est de plus en plus altérée et plusieurs situations peuvent la causer comme : les problèmes obstructifs, hormonaux, immunologiques et la varicocèle, mais chez plus de 25% des cas aucune cause identifiable n'est trouvée, on parle donc d'une infertilité idiopathique dont l'une des causes probablement impliquées est le stress oxydatif (Haiba *et al.*, 2014). La détérioration du potentiel de fertilité masculine a été liée par plusieurs auteurs au stress oxydatif car les spermatozoïdes morphologiquement anormaux ont une capacité accrue à générer des espèces réactives d'oxygène (ERO), mais ont aussi une capacité antioxydante très réduite (Tremellen 2008). La génération d'EROs dans le tractus reproducteur masculin est devenue une préoccupation réelle en raison de leurs effets toxiques potentiels, à des niveaux élevés, sur la qualité et le fonctionnement du sperme (El-Tohamy 2012).

Les spermatozoïdes sont particulièrement sensibles aux dommages induits par les ERO pour plusieurs raisons, tels que le manque de mécanismes de réparation de l'ADN dans les cellules spermatiques, les niveaux élevés d'acides gras poly insaturés contenus dans les membranes des spermatozoïdes, la capacité des spermatozoïdes à produire des ERO, les très faibles niveaux d'enzymes antioxydantes cytoplasmiques et au fait que les spermatozoïdes passent de longues périodes en tant que cellules isolées dans les voies génitales masculines et féminines (Agarwal *et al.*, 2008).

Les oxydants interfèrent avec la fonction normale du sperme grâce à la peroxydation des lipides membranaires et à la fragmentation des acides nucléiques, ce qui cause une altération et un dysfonctionnement des cellules spermatiques, entraînant une réduction du pouvoir fécondant du sperme tels que la vitalité, la morphologie, la motilité du sperme et sa capacité à se lier et se fusionner avec l'ovocyte (Agarwal *et a.*, 2005 ; Nabil *et al.*, 2008; Makker *et al.*, 2009).

Le plasma séminal est bien fourni avec des antioxydants. D'ailleurs, il est considéré comme le liquide biologique qui contient la plus grande quantité et variété d'antioxydants (Hankel 2011) qui sont des agents de piégeage des radicaux libres pour protéger les spermatozoïdes contre les attaques de stress oxydatif. Le sperme contient un système enzymatique hautement spécialisé

constitué essentiellement de superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPX) et catalase (CAT) (**Tavilani et al., 2008**). SOD et CAT sont les antioxydants qui inactivent l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le radical peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en le convertissant en  $H_2O$  et  $O_2$ . GPX est le dernier élément du système antioxydant enzymatique séminal, il est incriminé dans la réduction des hydroperoxydes en utilisant le glutathion comme un donneur d'électrons (**Vernet et al., 2004**).

Les activités antioxydantes enzymatiques et les polymorphismes dans les gènes antioxydants sont excessivement étudiés ces dernières années et sont associés à de nombreuses maladies, en particulier celles de causes inconnues (idiopathiques), mais leur implication dans l'infertilité masculine idiopathique reste une piste peu explorée. Des progrès récents dans l'étude des variations génétiques des gènes antioxydants associés à l'infertilité masculine sont remarquables, les résultats de ces études indiquent que les polymorphismes fonctionnels dans Les gènes NRF2, SOD, GST, NOS, CAT et GPX peuvent potentiellement contribuer aux causes génétiques de l'infertilité masculine.

Comme l'incidence de l'infertilité de l'homme continue d'augmenter, l'analyse de son association avec des variantes de séquence dans un gène antioxydant peut non seulement aider à comprendre les rôles du réseau de signalisation antioxydante dans l'infertilité masculine liée au stress oxydatif, mais aussi faciliter la validation de son usage potentiel en tant que marqueurs génétiques pour le diagnostic et l'évaluation des risques liés à l'infertilité masculine dans la clinique (**Yu and Huang 2015**).

La notion de "stress oxydant" et d' "antioxydants", par ses deux aspects biochimiques et moléculaires, est de plus en plus utilisée pour expliquer différentes atteintes pathologiques et leurs approches thérapeutiques. Le but principal de ce travail est donc, i) d'évaluer le statut oxydatif séminal chez des hommes avec une infertilité idiopathique à travers ; un dosage biochimique qui reflète le taux de la peroxydation lipidique et des radicaux libres (dosage de malondialdéhyde, MDA), et des mesures photométriques des activités des principales enzymes antioxydantes (SOD, GPX et CAT), afin de chercher une éventuelle relation entre le statut oxydatif séminal et les différentes anomalies spermiologiques rencontrées. ii) d'étudier deux polymorphismes génétiques de type SNP (single nucleotide polymorphism) (CAT -262C/T, SOD 362G/A), pour déterminer une association probable entre les variantes de ces gènes et les activités enzymatiques concernées ainsi qu'avec les différents cas d'infertilité masculine inclus dans notre étude. Les paramètres ciblés par cette étude pourraient être des bio-marqueurs utiles pour l'évaluation des dommages oxydatifs spermatiques et peuvent améliorer les outils de diagnostic de ce problème de santé et permettre une meilleure stratégie thérapeutique.

*Partie 1*  
*Synthèse bibliographique*

## *Chapitre I*

# *Infertilité masculine : notions et concepts fondamentaux*

### **I.1. Définition et épidémiologie de l'infertilité masculine**

La reproduction est une fonction physiologique qui comprend de nombreuses étapes, telles que la formation des gamètes males et femelles, la fécondation, le développement préimplantatoire, l'implantation et le développement postimplantatoire. Ainsi l'aptitude à procréer dépend du bon fonctionnement coordonné des systèmes reproducteurs mâle et femelle.

La fertilité correspond à une aptitude, celle d'un couple à concevoir; elle exprime une probabilité, elle est aussi définie comme la capacité de produire une descendance. L'infertilité masculine est, par sa fréquence et son impact sur la qualité de vie, un vrai problème de Santé. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'infertilité est définie comme l'incapacité à obtenir une grossesse en dépit d'une activité sexuelle régulière durant plus d'un an sans méthode contraceptive (OMS 2010).

Une maladie, est par définition, toute déviation ou interruption de la structure normale ou de la fonction de n'importe qu'elle partie, organe, système, ou une combinaison de ceux-ci dans le corps, en se manifestant par un ensemble de caractéristiques, de symptômes ou de signes. La notion de l'infertilité masculine répond à ces critères et devrait donc être considérée comme une maladie (Winters et Walsh 2014 ; Turchi 2015).

Des données épidémiologiques concluent qu'environ 15 % des couples sont confrontés à des difficultés de concevoir et sont amenés à consulter un médecin pour ce problème (Trussell 2013). Dans environ la moitié de ces cas, un facteur masculin est en cause (OMS 2010), mais il est toutefois difficile de déterminer qui est le partenaire exacte qui apporte la plus grande contribution à ce problème de santé dans un couple, et cette difficulté est une caractéristique de l'infertilité, dans laquelle il n'y a pas de conclusions pathognomonique qui confirme une certitude de diagnostique. Cette difficulté est également une limitation importante des études épidémiologiques, dans lesquelles le facteur masculin est souvent sous-évalué et sous-estimé (Turchi 2015). Un certain nombre d'études estiment que le nombre de couples infertiles à travers le monde atteindrait des valeurs comprises entre 50 et 130 millions (Agarwal *et al.*, 2015).

L'infertilité masculine est aussi définie comme étant un syndrome multifactoriel englobant une grande variété de troubles. Cependant, pour plus de la moitié des hommes infertiles, la cause est inconnue et peut être congénitale ou acquise (Bhasin *et al.*, 1997; Poongothai *et al.*, 2009).

Malgré le nombre important des études épidémiologiques et en tenant compte de toutes les données disponibles aujourd'hui, nul ne peut définir la prévalence exacte de l'infertilité masculine. Le seul aspect trouvé dans la littérature scientifique est que l'infertilité masculine est variable avec une multitude de facteurs (la race, le pays, la géographie, les variables socioéconomiques, les expositions environnementales et professionnelles, l'âge et la fertilité du partenaire, etc...).

## **I.2. Etiologie de l'infertilité masculine**

La fertilité naturelle de l'homme implique la succession de plusieurs phénomènes physiologiques, commençant par une différenciation de la gonade en testicule lors de la vie fœtale, une puberté avec une production hormonale d'androgènes, principalement de testostérone, la production de spermatozoïdes par les testicules, la perméabilité des voies génitales post-testiculaires, la formation du sperme, son cheminement et son dépôt dans les voies génitales féminines, un nombre suffisant de spermatozoïdes fonctionnels dans l'éjaculat, une maturation des spermatozoïdes dans les voies génitales masculines et féminines, une capacité d'interagir efficacement avec l'ovocyte. Des perturbations de différentes origines peuvent se manifester à chacune de ses étapes et être responsables d'infertilité ou de stérilité de l'homme.

Les infertilités masculines peuvent schématiquement être expliquées par 3 principaux mécanismes ;

- ✓ Un hypogonadisme sévère qui empêche ou interrompt l'activation testiculaire nécessaire à la production de spermatozoïdes : il s'agit là d'une cause dite «pré-testiculaire»
- ✓ Des maladies ou des atteintes primitivement testiculaires altérant le déroulement de la spermatogenèse et il s'agit là de causes dites «testiculaires »
- ✓ Des lésions empêchant l'évacuation des spermatozoïdes en dehors des testicules et il s'agit de causes dites «post-testiculaires».

A côté de ces principaux mécanismes, il en reste des infertilités masculines dites « idiopathiques » dont la cause est inconnue et/ou l'étiologie est difficile à identifier actuellement avec les outils de diagnostic présents.

### ***1.2.1. Causes Pré-testiculaires***

Il faut se rappeler que la santé sexuelle et reproductive de l'homme dépend de l'intégrité des fonctions testiculaires endocrines et exocrines, contrôlées par les gonadotrophines hypophysaires. La fonction testiculaire endocrine comprend la synthèse des stéroïdes sexuels par les cellules de

Leydig, elle est responsable, à partir de la puberté, de la virilisation et de l'apparition du désir sexuel (libido). La synthèse de testostérone est sous la dépendance de la gonadotrophine hypophysaire, l'hormone lutéinisante (LH). La fonction exocrine assure la production de spermatozoïdes matures. Elle a lieu dans le tube séminifère sous la dépendance obligatoire et concomitante des deux gonadotrophines hypophysaires (**Trabado et al., 2014**).

L'hormone foliculo stimulante (FSH) stimule directement la cellule de Sertoli (CS) alors que l'hormone lutéinisante (LH) agit aussi sur la CS: elle le fait de manière indirecte en stimulant la production locale de testostérone qui agit, de façon paracrine, sur le récepteur aux androgènes exprimé dans ces cellules. Cette double influence hormonale entraîne une prolifération puis une maturation des CS (**Trabado et al., 2014**). Les CS stimulées vont à leur tour déclencher la production locale de messagers, par exemple ; les facteurs de transcription, qui activent, par un mécanisme paracrine, la lignée germinale. Grâce à cette double stimulation hormonale (FSH et LH), se met en place la multiplication et le renouvellement des cellules souches (spermatogonies) puis leur différenciation en spermatocytes qui les conduit successivement aux divisions méiotiques puis à la différenciation terminale en spermatozoïdes matures (spermiogenèse) et enfin à leur excrétion dans la lumière des tubes séminifères (spermiation) (**Griswold, 2016**).

L'hypogonadisme chez l'homme peut être défini comme un syndrome clinique qui résulte du défaut de production endocrine et/ou exocrine testiculaire (de testostérone et/ou de sperme). Les manifestations cliniques peuvent inclure une baisse de la libido, des troubles érectiles, une ostéopénie/ostéoporose, et/ou une infertilité. Selon l'organe atteint, l'hypogonadisme est classé en deux catégories: primaire ou aussi qualifié d'hypogonadisme hypergonadotrope (atteinte testiculaire avec LH et FSH élevées) ou secondaire, qualifié d'hypogonadisme hypogonadotrope (atteinte de l'hypophyse et/ou de l'hypothalamus avec LH et FSH basses ou paradoxalement normales) (**Cheng et al., 2015**).

#### **1.2.1.1. Hypogonadisme hypergonadotrope**

La perturbation principale est une fonction testiculaire insuffisante ou absente. Les gonadotrophines sont élevées suite à un manque de rétrocontrôle négatif de l'estradiol, la testostérone et l'inhibine B par les testicules. Sans sécrétion appropriée d'androgènes, la spermatogenèse est altérée. Généralement ces hommes présentent aussi une atrophie testiculaire avec fibrose et une réduction du nombre de cellules germinales, conduisant également à des niveaux anormalement bas de la spermatogenèse (**Haywood et al., 2012**).

L'hypogonadisme hypergonadotrope peut avoir des origines génétiques (citons à titre d'exemple ; le syndrome de Klinefelter, mutations des récepteurs LH et FSH) ou bien des origines acquises comprennent la destruction du tissu gonadique normale par la chimiothérapie ou la radiothérapie, les traumatismes, les orchites ourliennes, le VIH, la cirrhose hépatique ou le déclin des androgènes chez l'homme vieillissant (**Haywood et al., 2012, Cheng et al., 2015**).

### **I.2.1.2. Hypogonadisme hypogonadotrope**

Comme son nom l'indique, l'hypogonadisme hypogonadotrophique est un état de carence en testostérone associé à des taux de gonadotrophines abaissés (FSH et LH). (**Haywood et al., 2012**). Il affecte la fertilité à multiples niveaux. La production de spermatozoïdes est négativement affectée par un manque de testostérone et l'absence de l'effet stimulant sur le complexe cellulaire Sertoli / cellules germinales. La fonction sexuelle est également affectée négativement avec les effets observés au niveau de la fonction érectile, la fonction éjaculatoire, et le désir sexuel (**Herbert et al., 2012**).

Hypogonadisme hypogonadotrope idiopathique congénital est caractérisé par une absence ou une maturation incomplète sexuelle à l'âge de 18 ans, avec micropénis et/ou cryptorchidie, des taux abaissés de gonadotrophines circulantes et de testostérone, sans autre anomalie de l'axe hypothalamohypophysaire. Il s'agit d'un défaut de sécrétion et/ou d'action du GnRH (*gonadotropin releasing hormone*) hypothalamique. Il peut s'accompagner d'une anosmie ou d'une hyposmie liées à une hypoplasie des bulbes olfactifs caractéristique du syndrome de Kallmann (**Raivio et al., 2007**).

Parmi les nombreuses causes d'un hypogonadisme hypogonadotrope lié à une infertilité par interruption de la production testiculaire de spermatozoïdes, on cite tout particulièrement

- ✓ Les mutations de *GNRH1, GNRHR, KISS1, KISS1R, TAC3, TACR3, KALI (ANOS1), FGFR1, FGF8, PROK2, PROKR2, WDR11, CHD7, SEMA3A, SOX10, FEZF1, IL17RD, FGF17* qui sont à l'origine d'un hypogonadisme hypogonadotrophe congénital,
- ✓ Les tumeurs de la région hypothalamo-hypophysaire, Radiothérapie hypophysaire ou encéphalique,
- ✓ Processus infiltratifs hypothalamo-hypophysaires,
- ✓ Chirurgie de la région hypothalamo-hypophysaire,
- ✓ Traumatisme crânien,
- ✓ Hyperprolactinémie,

- ✓ Hypercortisolisme,
- ✓ Causes médicamenteuses (androgènes, anabolisants, oestroprogestatifs qui sont à l'origine d'un hypogonadisme hypogonadotrope acquis (**Haywood et al., 2012 ; Cheng et al., 2015 ; Young 2016**)).

### **I.2.2. Causes testiculaires**

Une spermatogénèse altérée est de loin la cause la plus fréquente de l'infertilité masculine. Elle peut s'agir d'une absence totale de production des spermatozoïdes, dans ce cas, on parle d'une azoospermie sécrétoire ou de perturbations quantitatives et/ou qualitatives de la spermatogénèse se manifestant par des perturbations du nombre, de mobilité, de morphologie et des capacités fonctionnelles des spermatozoïdes présents dans l'éjaculat.

#### **I.2.2.1. L'origine cytogénétiques et génétiques**

Les altérations primitives de la spermatogénèse peuvent avoir une origine cytogénétique. Des anomalies chromosomiques sont trouvées chez 5 % des hommes infertiles et leur incidence atteint 15 % en cas d'azoospermie. La spermatogénèse testiculaire peut être drastiquement affectée par des anomalies chromosomiques touchant les gonosomes (chromosomes sexuels X ou Y) ou les autosomes (**Nieschlag et al., 2014 ; Krausz et al., 2015 ; Plotton et al., 2015**). Ainsi, dans le syndrome de Klinefelter (SK) le chromosome X surnuméraire induit une altération du renouvellement des cellules souches spermatogoniales et une apoptose des spermatogonies, ce qui provoque une interruption précoce de la spermatogénèse à un stade pré-méiotique (**Oates, 2012**).

Il n'est pas rare de trouver chez des patients avec une production spermatique absente ou très diminuée, des micros délétions de la région AZF du bras long (Yq) du chromosome Y. Le premier cas d'une infertilité masculine liée aux microdélétions au niveau du chromosome Y a été signalé en 1992 (**Ma et al., 1992**), et depuis de nombreuses études de cas ont été publiées. Cette région contient plusieurs gènes nécessaires au maintien, au développement et à la différenciation des cellules germinales masculines. En cas de délétion de la région AZFa qui contient les gènes USP9Y et DBY, il n'y a en règle générale aucune cellule germinale dans les tubes séminifères. La délétion d'AZFb où est localisé le gène RBMY est associée à un arrêt de la spermatogénèse au stade spermatocyte. Des phénotypes très variables peuvent être observés en cas de délétion de la région AZFc qui contient notamment plusieurs copies du gène DAZ (**Luddi et al., 2009., Jaques., 2016**).

Dans d'autres cas, on observe des déficits de la spermatogénèse qui sont beaucoup plus qualitatifs et aboutissent à la formation de spermatozoïdes anormaux incapables de féconder. On cite ;

- ✓ la délétion d'un seul nucléotide de la région codante du gène AURKC associé à la production de spermatozoïdes macrocéphales et polyploïdes (**Dieterich *et al.*, 2007**),
- ✓ des mutations de gènes de la famille CATSPER, qui contrôlent la formation et la fonction de canaux calciques membranaires régulant la mobilité des spermatozoïdes, ont été trouvées en cas de stérilité avec absence de mobilité spermatique (**Hildebrand *et al.*, 2010**),
- ✓ une délétion du gène DEFB 126 qui cause un déficit d'une glycoprotéine de type defensin qui est normalement adsorbée sur la membrane des spermatozoïdes pendant leur transit dans l'épididyme, qui les protège contre le système immunitaire de la femme, cette mutation est aussi à l'origine d'une infertilité réduite, surtout à l'état homozygote (**Tollner *et al.*, 2012**),
- ✓ des délétions du gène DPY19L2 sont responsables d'anomalies de la formation de l'acrosome et de l'allongement de la tête spermatique durant la spermiogénèse (**Harbuz *et al.*, 2011 ; Koscinski *et al.*, 2011**),
- ✓ des mutations des récepteurs de la FSH, qui empêchent la stimulation des cellules de Sertoli par cette gonadotrophine (**Cheng *et al.*, 2015**).

### I.2.2.2. Cancer et des traitements anticancéreux

Tumeurs et cancer du testicule, est le premier cancer de l'adulte jeune avant 40 ans et son incidence augmente depuis plusieurs décennies dans la quasi-totalité des pays industrialisés (**Huyghe *et al.*, 2003**). Au moment du diagnostic de la maladie, avant même l'initiation des traitements, la population des hommes atteints d'un cancer des testicules apparaît hypofertile (**Huyghe et Thonneau 2006**). Le cancer des testicules survenant souvent chez des patients présentant des antécédents de cryptorchidie, ce qui est déjà un facteur d'infertilité en soi. Il peut également y avoir des facteurs endocriniens qui altèrent la spermatogénèse (**Ravel *et al.*, 2009**).

Les tumeurs du testicule peuvent modifier l'équilibre hormonal, soit en synthétisant des hormones, soit en modifiant leur métabolisme périphérique. De même, la chimiothérapie et la radiothérapie utilisées dans le traitement des cancers y compris le cancer des testicules ont des conséquences néfastes sur la spermatogénèse (**Huyghe et Thonneau 2006**), l'altération de la fertilité après traitements cancéreux est variables selon les effets de chimiothérapie et de la radiothérapie dépendants de la molécule utilisée, de la dose, de la localisation et la surface traitée,

de l'intensité de traitement et bien évidemment de l'âge du malade (**Ravel et al., 2009**). Le déficit de production des spermatozoïdes peut être aussi secondaire à un traitement par des drogues d'usage plus courant dont les effets sont plus légers et généralement réversibles (**Amory 2007**).

### I.2.2.3. L'origine malformative

**La cryptorchidie** qui est une anomalie congénitale de migration, ou les testicules restent localisés dans la cavité abdominale ou au niveau du canal inguinal. Elle survient chez 2% à 3% des nouveau-nés mâles. Elle peut être unilatérale dans 60% à 80% des cas ou bilatérale dans 20% à 40%, elle est fréquemment retrouvée chez les patients infertiles (**Ferlin et al., 2007**). La cryptorchidie bilatérale a des effets plus graves que la cryptorchidie unilatérale, et les testicules plus élevés ayant une fonction plus altérée que les testicules inférieurs (**Lee et al., 1997 ; Trsinar et Muravec 2009**). La physiopathologie des effets de la cryptorchidie est complexe, avec la chaleur susceptible de jouer un rôle partiel mais significative (**Setchell 1998 ; Murphy et al., 2007**), d'autre part, une origine génétique est fortement suspectée car la descente testiculaire est sous la dépendance d'un certain nombre de gènes dont la mutation entraînerait une cryptorchidie : *INSL 3* et son récepteur *LGR8*, *AMH* (hormone anti mullerienne) et son récepteur de type II, androgènes et récepteur aux androgènes (**Ferlin et al., 2007**).

**La torsion du testicule** s'agit quand à elle d'une torsion du pédicule spermatique. Elle est liée à une anomalie congénitale de fixation du pôle inférieur du testicule à la face profonde du scrotum, permettant ainsi une rotation possible autour de l'axe du cordon spermatique. L'artère spermatique se trouve alors comprimée, entraînant une ischémie du testicule (**Ravel et al., 2009**).

### I.2.2.4. L'origine vasculaire

**La varicocèle** est la présence d'une dilatation variqueuse du plexus antérieur du testicule, la varicocèle est, dans 75 % des cas latéralisée à gauche. Le plus souvent, la dilatation du plexus antérieur est primitive. Elle est provoquée par la position debout qui favorise la stase du côté gauche du fait du long trajet veineux vertical et de l'angle droit entre la veine rénale gauche et la veine cave inférieure. (**Muratorio et al., 2013**).

L'augmentation de la température intra testiculaire semble être l'une des explications les plus plausibles pour rendre compte des altérations de la spermatogenèse chez les hommes présentant une varicocèle. En effet, une augmentation de la chaleur intra testiculaire ou intra-

épididymaire, même modérée, occasionnerait des cassures au niveau de la chromatine des spermatozoïdes, avant même d'entraîner une altération de leur production (**Ahmad et al., 2012**). Il a été démontré ; il ya plus de 50 ans, l'existence d'une association entre la varicocèle et la tératozoospermie caractérisée par une microcéphalie, des têtes allongées ou amincies et des anomalies de la pièce intermédiaire comme une angulation ou des restes cytoplasmiques (**MacLeod 1965**). Une étude réalisée par l'OMS dans 24 pays a rapporté la présence d'une varicocèle chez 25 % des 3626 hommes qui avaient des anomalies spermatiques alors qu'elle n'était observée que chez 12 % des 3468 hommes à Spermie normale (**OMS 1992**). Dans cette étude, ils ont observé une altération isolée du nombre de spermatozoïdes sans atteinte de la mobilité ni de la morphologie des spermatozoïdes. En revanche, une autre étude a démontré une association de la diminution de la mobilité et de la concentration en spermatozoïdes avec une varicocèle, quel que soit le grade de celle-ci (**Mori et al., 2008**). Néanmoins, la diminution de la mobilité est plus importante quand le grade de la varicocèle est plus élevé.

### **I.2.3. Causes post testiculaires**

L'infertilité masculine peut être la conséquence d'un obstacle au niveau des voies génitales empêchant les spermatozoïdes de venir se mélanger au liquide séminal au moment de l'éjaculation. On parle d'azoospermie obstructive. La cause la plus fréquente est l'agénésie unilatérale ou bilatérale des canaux déférents qui est en général liée à des mutations du gène CFTR ou à une malformation rénale.

#### **I.2.3.1. L'absence bilatérale congénitale des canaux déférents (ABCD)**

Est une malformation représentant environ 2 % des cas d'infertilité masculine et près de 25 % des azoospermies obstructives. C'est une maladie génétique autosomique récessive, son diagnostic est clinique, échographique et biologique par la constatation d'une azoospermie associée à un effondrement des marqueurs biochimiques séminaux d'origine épидидymaire et vésiculaires. Le fait que cette malformation soit présente chez près de 98 % des hommes atteints de mucoviscidose a fait suspecter que les patients infertiles présentant une CBAVD isolée pouvaient être porteurs d'une mutation à l'état hétérozygote du gène CFTR, présentant alors une forme fruste, ou génitale pure, de la maladie (**Gaillard et al., 1997, Yu et al., 2012., Jaques, 2016**). Lors d'une obstruction bilatérale de l'épididyme, des canaux déférents ou éjaculateurs, une origine infectieuse doit être recherchée (gonocoque, Chlamydiae), surtout s'il existe une leucospermie (PNN > 1 million/ml) (**Huyghe et al., 2007**).

L'obstruction peut être consécutive à une infection, un traumatisme ou une intervention chirurgicale. Parmi les obstacles post-testiculaires, il faut citer les ligatures volontaires des déférents pratiquées lors des vasectomies et les ligatures involontaires des déférents lors de chirurgies pour hernie inguinale. Enfin, toute infection des voies excrétrices peut potentiellement entraîner des lésions suivies de séquelles à type obstacle même si leur prévalence est discutée dans la littérature. Elles concerneraient particulièrement les canaux éjaculateurs situés au niveau prostatique (**Young 2016**).

### I.2.3.2. Les infections

Les infections qui touchent l'appareil génital sont potentiellement des causes corrigibles de l'infertilité masculine et jouent un rôle majeur dans ce problème (**Henkel 2011**). La prévalence de l'infertilité masculine liée à l'infection des voies génitales varie entre 10 et 20% et atteint jusqu'à 35% dans une grande étude comprenant plus de 4000 patients consultant pour infertilité (**Henkel et al., 2007**).

L'infections et l'inflammation n'affectent pas seulement la spermatogenèse et le tractus séminal pendant l'éjaculation, mais sont aussi la cause d'un dysfonctionnement des glandes annexes mâles (**Henkel 2011 ; Weidner 2002 ; Schuppe 2008**) et d'une diminution des fonctions de sperme (**Henkel et Schill 1998 ; Sanocka-Maciejewska et al., 2005**). Ces changements peuvent être déclenchés par différentes manières, l'action directe des agents pathogènes sur les spermatozoïdes et les fonctions de sperme (**Henkel 2011**) ou indirectement en induisant des processus inflammatoires dans le tractus séminal par l'activation des leucocytes (**Eggert-Kruse et al., 2007**).

Les agents pathogènes les plus courants sont *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* ou *Escherichia coli* (**Henkel 2011**). *E. coli* est considérée comme la cause la plus fréquente d'infection des voies urogénitales, notamment des orchépididymites ou des prostatites où elle est la cause de 65-80% des cas (**Pellati et al., 2008**). En outre, les infections virales comme le virus des oreillons, le papillomavirus humain (HPV), le virus de l'herpès simplex (HSV) et particulièrement le virus d'immunodéficience humaine (VIH) sont également été associés à des concentrations élevés des leucocytes séminales (**Umopathy et al., 2001**).

### I.2.3.3. Les dysfonctions sexuelles

Elles sont une cause d'infertilité masculine quand elles perturbent l'éjaculation et ne permettent pas au sperme d'accéder aux voies génitales féminines. Indépendamment des troubles de l'érection et de l'éjaculation d'origine psychogène, les pathologies les plus fréquentes sont neurologiques et principalement les lésions médullaires qui sont responsables d'anéjaculation ou d'éjaculation rétrograde (**Fode et al., 2012**). L'infertilité peut être traitée assez facilement quand il est possible de récupérer les spermatozoïdes dans les urines ou de stimuler l'éjaculation de manière appropriée pour réaliser une assistance médicale à la procréation (AMP) (**Jefferys et al., 2012**).

L'infertilité excrétoire peut être d'origine mécanique, il s'agit des dysfonctions érectiles et éjaculatoires : elles ne sont pas réellement causes d'infertilité mais, dans la mesure où les rapports sexuels deviennent difficiles, voire impossibles, il s'agit de conditions entraînant une incapacité à procréer (**Ravel et al., 2009**).

- **La dysfonction érectile** ; est un symptôme défini par l'incapacité persistante ou récurrente à obtenir ou maintenir une érection permettant un rapport sexuel satisfaisant (**Giuliano et Droupy 2013**). Elle peut être modérée, se manifestant par une diminution de la rigidité, de la taille ou de la dureté de l'érection, ou bien plus sévère allant jusqu'à l'absence totale de rigidité avec une flaccidité rebelle. La dysfonction érectile provient à la fois de facteurs biologiques et psychologiques et est souvent le témoin d'une difficulté relationnelle d'un couple (**Lebret et Cour 2005**).
- Dans **l'éjaculation rétrograde** ; il y a une altération spécifique de la fermeture du col de la vessie. Après l'émission séminale, le sperme qui est déposé dans l'urètre flux vers l'arrière dans la vessie, car il n'y a rien pour l'empêcher. Le patient peut remarquer un trouble de l'urine après l'orgasme, ce qui indique que le sperme est mélangé avec l'urine (**Fode et al., 2012**). Il s'agit d'un diagnostic à évoquer systématiquement devant un petit volume d'éjaculat lors du spermogramme (**Ravel et al., 2009**). Des Causes médicales (diabète, alpha-bloquants) et/ou chirurgicales (chirurgie du col vésical, curage ganglionnaire rétropéritonéal) peuvent être responsables d'éjaculation rétrograde ou d'anéjaculation (**Huyghe et al., 2007**).

#### I.2.4. Infertilités masculines idiopathiques

Dans les cas d'infertilités, au terme du bilan étiologique, une cause est identifiée chez 6 hommes sur 10 et un traitement spécifique éventuellement proposé (Methorst *et al.*, 2014). Cependant, Les infertilités dites idiopathiques seraient à l'origine de près de 50% des infertilités (Agarwal *et al.*, 2015 ; Krausz *et al.*, 2015). Il s'agit d'hommes ayant une fonction gonadotrope normale et chez qui l'exploration des voies excrétrices n'a pas permis de mettre en évidence d'obstacle. Chez ces patients, le caryotype et les explorations génétiques de première ligne ne montrent pas d'anomalie. Les altérations de la spermatogenèse testiculaire sont fréquentes. Donc une infertilité idiopathique comprend toute celle pour laquelle aucune cause n'est identifiée mais une origine génétique (Ravel *et al.*, 2009) ou environnementale peut être suspectée. Elles restent souvent inexplicables en raison du très grand nombre de gènes et facteurs impliqués dans la spermatogenèse.

Une des principales hypothèses actuelles concernant l'infertilité masculine idiopathique est une atteinte liée au stress oxydant, car 30 à 40 % des hommes infertiles ont des niveaux élevés des dérivés actifs de l'oxygène dans le liquide séminal (Methorst *et al.*, 2014). Les spermatozoïdes ont une faible activité transcriptionnelle et un volume cytoplasmique limité. Ils sont dans l'incapacité de répondre à un stress oxydant en produisant de novo des antioxydants ou en réparant le matériel cellulaire altéré. Même si certains antioxydants sont présents dans les spermatozoïdes, le liquide séminal confère la meilleure protection des gamètes contre les ERO (Espèces *reactives de l'oxygène*). Lorsque les ERO surpassent les systèmes de défense antioxydant et perturbent l'équilibre complexe entre ERO et antioxydants, les anomalies pathologiques se produisent selon la nature, la quantité des ERO et la durée de leur impact. Leurs conséquences sont la dégradation de lipides, de protéines, et de l'ADN (Methorst *et al.*, 2014). Les membranes cellulaires du spermatozoïde sont riches en acides gras polyinsaturés le rendant très vulnérable à l'oxydation et à la peroxydation lipidique qui augmente les anomalies dans la pièce intermédiaire, avec pour conséquence une diminution de la mobilité du spermatozoïde (Bansal et Bilaspuri 2010 ; Gharagozloo et Aitken 2011).

A côté d'une diminution de la mobilité, la production excessive d'ERO est aussi associée à une atteinte de la concentration des spermatozoïdes et à des défauts de leur morphologie. Ces paramètres sont les principaux paramètres corrélés avec la fertilité masculine (Methorst *et al.*, 2014).

L'impact du stress oxydant sur le spermatozoïde pourrait également aboutir à une baisse du pouvoir fécondant du spermatozoïde et du développement embryonnaire (**Tremellen 2008 ; Butler et al., 2002**). Il est à noter, que parfois même quand une étiologie est retrouvée, une augmentation du stress oxydant peut être constatée, et des données récentes mettent le stress oxydant au cœur de la physiopathologie de l'infertilité masculine (**Methorst et al., 2014**).

### **I.3. Exploration de l'homme infertile**

L'évaluation minimale complète de chaque homme infertile doit inclure l'histoire médicale et reproductive complète, un examen physique réalisé par un urologue ou un autre spécialiste de la reproduction masculine et au moins deux spermogrammes espacés de 2 à 3 mois. En fonction des résultats de ce premier bilan, des examens complémentaires peuvent s'avérer nécessaires (**Huyghe et al., 2008**).

#### **I.3.1. Bilan clinique initial**

##### **I.3.1.1. Interrogatoire**

Il vise à recueillir des données du passé familial ou personnel en faveur de causes évidentes d'infertilité. Il représente l'élément principal de la consultation et il s'attache à rechercher au niveau familial, des antécédents d'infertilité, de cancers de l'appareil urogénital et de maladies génétiques (chromosomes, mucoviscidose...) (**Marcelli et al., 2009**). Il précise aussi la nature de l'infertilité: primaire ou secondaire en cas de paternité antérieure, sa durée, l'âge de la partenaire et les résultats des explorations et traitements déjà réalisés (**Schlosser et al., 2006**).

Les conditions et la qualité de la sexualité du couple doivent également être étudiées, contexte psychologique et social, fréquence des rapports sexuels au moment de l'ovulation, présence ou non de troubles érectiles et/ou éjaculatoires, utilisation de lubrifiants potentiellement toxiques pour les spermatozoïdes (**Burrows et al., 2002**).

Sur le plan des antécédents personnels, on s'intéresse à rechercher les événements susceptibles de perturber les fonctions testiculaires : âge et déroulement de la puberté, notions de traumatisme, d'épisodes de torsions ou de sub-torsions testiculaire, notions de traitement médical et/ou chirurgical de cryptorchidie uni- ou bilatérale, antécédents d'infections urogénitales (orchépididymites, orchite ourlienne, tuberculose génitale la notion de pathologies chroniques (diabète, affections respiratoires, neurologiques, psychiatriques...), de prise médicamenteuse au long cours (**Marcelli et al., 2009**), des antécédents de chirurgie inguinoscrotale (cryptorchidie, hernie inguinale), certaines expositions professionnelles, toxiques ou environnementales (tabagisme,

intoxication éthylique chronique, cocaïne, marijuana, etc...) sont aussi recherchées car elles représentent un risque pour la fertilité masculine (Schlosser *et al.*, 2006).

### I.3.1.2. Examen physique

L'examen physique général fait partie intégrante de l'évaluation d'un homme infertile. En outre, une attention particulière doit être prêter à l'examen des organes génitaux (Huyghe *et al.*, 2008)

- ✓ un examen du pénis, incluant la localisation du méat urétral (hypospadias) ;
- ✓ la palpation des testicules et la mesure de leur taille (cancer du testicule, hypotrophie, cryptorchidie, atrophie postorchiépididymite ou postorchite ourlienne) ;
- ✓ la présence et la consistance des déférents et épидидymes (recherche des signes obstructifs de la voie génitale). Le diagnostic d'agénésie congénitale bilatérale des déférents (ABCD) est établi par l'examen physique et ne nécessite pas d'exploration chirurgicale ;
- ✓ la recherche de varicocèle ;
- ✓ l'évaluation des caractères sexuels secondaires avec distribution de la pilosité, distribution des graisses, recherche de gynécomastie ;
- ✓ le toucher rectal est fortement recommandé (Huyghe *et al.*, 2007).

## I.3.2. Examens complémentaires de première intention

### I.3.2.1. Spermogramme

C'est l'examen clé d'un homme suspecté d'infertilité et doit être obligatoire et systématique devant toute infertilité du couple, qu'elle soit supposée d'origine féminine ou masculine (Huyghe *et al.*, 2007 ; Young 2016).

Le recueil se fait par masturbation et a lieu au laboratoire, après deux à cinq jours d'abstinence sexuelle. Les principaux paramètres qui sont évalués sont le volume du sperme, la concentration, la mobilité, la vitalité, les leucocytes (tableau 01) et sont classifiés selon les normes de l'OMS (2010). Si cet examen est normal, il n'est pas nécessaire de le répéter. En revanche, en cas d'anomalies constatées, compte tenu des grandes fluctuations physiologiques des paramètres spermatiques et de la durée d'un cycle de spermatogenèses (74 jours dans l'espèce humaine), il faudra le recontrôler au moins une fois, environ trois mois après le précédent. Cela permettra de savoir si les anomalies constatées initialement se confirment ou si elles étaient transitoires (Marcelli *et al.*, 2009).

### I.3.2.2. Spermocytogramme

Il s'agit de l'analyse morphologique des spermatozoïdes qui comprend l'évaluation du pourcentage des gamètes morphologiquement normaux, ainsi que l'incidence des différents types d'anomalies. C'est un examen apparemment simple, mais dont la pratique réelle soulève de nombreuses difficultés d'ordre technique (préparation des frottis, méthode de coloration, systèmes de classification différents, etc.) mais aussi subjectif, liées à l'opérateur entraînant une mauvaise fiabilité des résultats selon les laboratoires (**Auger et Eustache 2000 ; Ravel et al., 2009**). Enfin, la classification utilisée pour répertorier les anomalies, celle de David ou celle de Kruger, introduit elle-même des discordances supplémentaires qui se trouvent encore amplifiées par la subjectivité des observateurs dans leur façon de considérer qu'un spermatozoïde est anormal ou non (**Clavert et al., 1999**). Quoiqu'il en soit, selon l'OMS, un spermocytogramme est considéré comme anormal si le sperme contient moins de 4 % de spermatozoïdes typiques.

**Tableau 01.** Limites inférieure de référence pour les caractéristiques du sperme (**OMS 2010**).

Paramètres	Limite inférieure de référence
<b>volume du sperme (mL)</b>	1.5 (1.4-1.7)
<b>Concentration de spz (10<sup>6</sup> par éjaculat)</b>	39 (33-46)
<b>Concentration de spz (10<sup>6</sup> par ml)</b>	15 (12-16)
<b>Mobilité total (%)</b>	40 (38-42)
<b>Mobilité progressive %</b>	32 (31-34)
<b>vitalité (%)</b>	58 (55-63)
<b>Morphologie normale (%)</b>	4 (3.0-4.0)
<b>PH</b>	≥7.2
<b>Concentration de leucocytes (10<sup>6</sup> par ml)</b>	<1.0

Le bilan spermatique peut être complété par d'autres tests visant à mesurer la survie des spermatozoïdes (indispensable, sachant qu'un gamète fécondant doit résister plusieurs heures dans le tractus génital féminin) que ce soit dans des prélèvements de glaire ou in vitro. Ces examens permettent d'orienter la décision thérapeutique (**Ravel et al., 2009**).

### I.3.2.3. Test postcoïtal de Hühner

C'est un examen microscopique du mucus cervical réalisé juste avant la date prévue d'ovulation, quelques heures après un rapport sexuel pour identifier la présence de spermatozoïdes mobiles dans la glaire. Ce test peut aider à identifier un rapport sexuel inefficace ou un facteur cervical qui ne serait pas suspecté sur l'historique, ou l'examen clinique (Zorn 2006). Ce test n'est pas réalisé systématiquement et n'a de signification qu'en cas de spermogramme normal (Schlosser *et al.*, 2006).

### I.3.2.4. Test de migration-survie

Réalisés en cas d'oligo-asthéo-tératozoospermie, il permet la sélection des spermatozoïdes mobiles et viables qui pourront être utilisés en assistance médicale à la procréation (AMP). Les deux principales méthodes de sélection sont la centrifugation sur gradient de densité et la migration ascendante (swim up) avec ou sans centrifugation (Jeyendran 2003). La survie à 24 heures des spermatozoïdes sélectionnés est un facteur pronostique favorable pour la fécondance du sperme (Burrows *et al.*, 2002).

## I.3.3. Examens complémentaires de seconde intention

### I.3.3.1. Spermoculture

Le sperme est un liquide physiologique normalement stérile grâce à une activité antibactérienne que possède le plasma séminal, donc la spermoculture comprend la recherche, sur des milieux spéciaux, de bactéries banales issues d'infections dont *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum*, de parasites (*Trichomonas*) et de levures. Cette analyse bactériologique doit être complétée par un prélèvement urétral ou du premier jet urinaire à la recherche de *Chlamydia trachomatis* (Ravel *et al.*, 2009).

La spermoculture est un examen de réalisation et d'interprétation délicate. L'examen nécessite un lavage des mains, de la verge et du prépuce, ainsi qu'une miction avant le recueil dans un récipient stérile. Elle est indiquée en cas de pH basique, d'hyperspermie, de leucospermie (plus de 1 million de leucocytes par millilitre), d'asthéo-térato-zoospermie et d'antécédents infectieux (Schlosser *et al.*, 2006). Elle sera, en revanche, systématique avant recours aux techniques d'AMP (Marcelli *et al.*, 2009).

### I.3.3.2. Bilan hormonale

Il est réalisé en cas d'azoospermie ou d'oligo-asthéo-zoospermie ou oligospermie sévère (< 5 millions/ml), de troubles érectiles avec baisse de la libido ou de signes cliniques d'endocrinopathie (**Schlosser et al., 2006**). Il comprend essentiellement ;

- Les dosages de la testostérone matinale et de la FSH plasmatique qui permettent de classer en première intention les oligo- et azoospermies en hypo- (diminution de la FSH, diminution de la testostérone), normo et hypergonadotrophiques (augmentation de la FSH, diminution de la testostérone) (**Rowe et al., 2000 ; Sigman et Jarow 1997**).
- Les dosages de l'hormone lutéinisante (LH) et de la prolactinémie sont indiqués en cas de baisse de la testostéronémie avec une FSH normale ou diminuée. Le dosage de la prolactinémie étant très sensible au stress et à l'effort, nécessite d'être confirmée par un deuxième dosage en cas d'une hyperprolactinémie (**Rowe et al., 2000**). Elle fait rechercher une cause médicamenteuse, une hypothyroïdie et une anomalie morphologique de l'axe pituitaire (**Schlosser et al., 2006**).
- Les tests dynamiques par stimulation à la gonadotropine releasing hormone (GnRH) ou l'hormone humaine choriogonadotrophique (hCG) permettent d'évaluer le niveau d'atteinte hypothalamohypophysaire ou un manque de réserve endocrine.
- Le dosage de l'inhibine B qui est une hormone corrélée à la spermatogenèse intratesticulaire (**Schlosser et al., 2006**), a essentiellement une valeur pronostique avant la biopsie testiculaire pour évaluer les possibilités d'extraction de spermatozoïdes (**Von Eckardstein et al., 1999 ; Tsujimura et al., 2004**).

### I.3.3.3. Analyse postéjaculatoire des urines

Un faible volume (hypospermie) ou une absence d'éjaculat (aspermie) doivent suggérer une éjaculation rétrograde, une mauvaise émission du sperme, une obstruction des canaux éjaculateurs, un hypogonadisme ou une agénésie déférentielle bilatérale. En l'absence d'anomalie du recueil du sperme qui reste la cause la plus fréquente des hypovolémies spermatiques, le diagnostic d'éjaculation rétrograde doit être évoqué devant tout volume inférieur à 1 ml chez des hommes n'ayant ni hypogonadisme, ni agénésie déférentielle bilatérale (**Huyghe et al., 2007**).

Elle est réalisée sur des urines alcalinisées après un orgasme. Le recueil peut être fractionné en deux parties. L'éjaculation rétrograde est suspectée si le nombre de spermatozoïdes retrouvés dans les urines est supérieur à celui de l'éjaculat ou s'il existe des spermatozoïdes dans la deuxième partie de la miction (**Rowe et al., 2000**). Cet examen différencie l'anéjaculation de l'éjaculation

rétrograde complète en cas d'aspermie. L'éjaculation rétrograde partielle doit être recherchée en cas d'hypospermie (**Schlosser *et al.*, 2006**).

#### **I.3.3.4. Bilan d'auto-immunisation antispermatozoïde**

L'auto-immunisation est recherchée en cas, d'asthénozoospermie, de nécrozoospermie, de stérilité inexplicée, d'auto-agglutinats spontanés du sperme, de test postcoïtal négatif ou de mauvaise qualité, d'antécédents de chirurgie urogénitale, d'obstruction congénitale ou acquise, d'infection ou inflammation génitale, d'échec de fécondation in vitro (**Barthelemy 2003**). Le rôle de l'auto-immunisation dans l'infertilité est probable si plus de 40 % des spermatozoïdes mobiles sont recouverts d'anticorps sur au moins un échantillon. (**De Almeida 2003**).

#### **I.3.3.5. Bilan radiologique**

L'échographie endorectale permet de visualiser les glandes annexes (prostate et vésicules séminales), les épидидymes, l'ampoule défférentielle et les canaux défférents. Elle peut mettre en évidence des malformations, des obstacles, des séquelles de prostatite, des kystes, des nodules (**Ravel *et al.*, 2009**). Certains experts recommandent une échographie transrectale chez les patients oligospermiques avec faible volume éjaculé, défférents palpables, volume testiculaire normal, pour déterminer s'il existe une obstruction des canaux éjaculateurs. L'échographie transrectale est aussi indiquée chez les patients azoospermes chez lesquels on suspecte une cause excrétoire. (**Jarow 1994**).

Échographie scrotale permet de mesurer la taille des testicules, d'objectiver une diminution éventuelle, de déterminer leur position et de rechercher d'éventuelles anomalies, en particulier la présence de calcifications testiculaires. Elle permet ainsi d'éliminer la présence de tumeur, pathologie relativement fréquente chez les hommes jeunes. Cette échographie est complétée par une exploration abdominale, à la recherche de malformations éventuelles (**Ravel *et al.*, 2009**).

#### **I.3.3.7. Etudes cytogénétiques et génétiques**

##### **A. Le caryotype**

Les anomalies chromosomiques sont présentes chez 7 % des hommes infertiles. La fréquence des anomalies du caryotype est inversement proportionnelle au nombre de spermatozoïdes : 10 à 15 % en cas d'azoospermie, 5 % en cas d'oligospermie et moins de 1 % en cas de normospermie. Les anomalies des chromosomes sexuels (syndrome de Klinefelter XXY) représentent environ deux tiers des anomalies chromosomiques observées chez l'homme infertile. L'étude du caryotype doit être proposée aux hommes qui présentent les cas suivants :

- ✓ une azoospermie non obstructive ;
- ✓ ou une oligospermie sévère inférieure à un million de spermatozoïdes /ml sur plusieurs prélèvements successifs;
- ✓ ou chez des sujets ayant une numération supérieure à un million/ml associée à des antécédents familiaux de troubles de la reproduction.

Pour certains experts, le caryotype doit être proposé à tous les hommes ayant un spermogramme anormal avant de réaliser une technique de FIV ou d'ICSI (**Huyghe et al., 2007**).

### ***B. Les mutations du gène ABCC7 (ex-CFTR)***

Tout homme ayant une agénésie unilatérale ou bilatérale des déférents (ou épидидymes) ou des symptômes de mucoviscidose doit être informé de la forte association entre agénésie vésiculodéférentielle et mutation du gène de la mucoviscidose (gène ABCC7, ex-CFTR) qui doit être recherchée chez lui. La découverte d'une mutation chez un homme infertile implique la recherche de mutation d'ABCC7 chez sa compagne. À noter que l'absence de détection d'une anomalie du gène ABCC7 n'élimine pas complètement la présence d'une mutation rare car seules les mutations les plus fréquentes sont recherchées (**Lewis-Jones et al., 2000**).

### ***C. Les microdélétions du chromosome Y***

Les microdélétions du chromosome Y sont retrouvées chez 10 à 15 % des hommes avec une azoospermie ou une oligospermie sévère. On distingue trois régions situées sur le bras long du chromosome Y, la région AZFa (proximale), AZFb (centrale) et AZFc (distale). La présence d'une délétion de la région AZFa ou AZFb est de très mauvais pronostic. En revanche une délétion de la région AZFc est compatible avec la découverte de spermatozoïdes dans l'éjaculat ou dans la biopsie testiculaire (**Huyghe et al., 2007**).

#### **I.3.3.8. Biochimie du sperme**

L'étude biochimique du sperme consiste à doser des marqueurs du plasma séminal spécifiques de chaque glande du tractus génital masculin qui, associés aux signes cliniques et à l'interrogatoire, vont permettre de mieux cibler les causes de l'infertilité. On distingue ainsi des marqueurs épидидymaires, comme la carnitine ou l'alpha-1-4glucosidase, des marqueurs des vésicules séminales, comme le fructose, et des marqueurs prostatiques comme le citrate, le zinc ou la phosphatase acide (**Roy et al., 2001**). Un taux abaissé d'un ou de plusieurs marqueurs oriente alors vers le niveau d'atteinte des voies génitales, elle peut s'avérer utile au diagnostic étiologique en cas

d'azoospermie ou d'oligozoospermie sévère, de suspicion d'infection, d'asthénozoospermie (**Ravel et al., 2009**).

#### I.4. Anomalies du sperme

La normozoospermie se définit par un nombre total (ou la concentration, selon les résultats rapportés) de spermatozoïde, aussi le pourcentage des spermatozoïdes à mobilité progressive et morphologiquement normaux, égal ou supérieur aux limites inférieures de référence (**OMS 2010**). Selon les atteintes physiopathologiques, plusieurs altérations peuvent toucher le sperme, que ce soit des altérations quantitative ou qualitative, les principales atteintes sont celles de nombre de spermatozoïdes et qui sont principalement l'azoospermie avec ses deux types et l'oligozoospermie qu'on peut classer en modérée et grave ;

- ✓ **Azoospermie** : c'est l'absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat (**OMS 2010**), on distingue deux types :
  - **L'azoospermie sécrétoire** (ou azoospermie non obstructive), c'est l'absence totale de la spermatogenèse qui se déroule dans le testicule, au niveau des tubes séminifères, l'origine de l'altération de la spermatogenèse peut être soit une affection testiculaire primitive congénitale ou acquise; soit une insuffisance hypothalamo-hypophysaire acquise congénitale (**Imade et al., 1993 ; Lemmens et al., 2004**) ou des anomalies génétiques tel que la microdélétion du chromosome Y.
  - **L'azoospermie excrétoire** (ou azoospermie obstructive) ou la spermatogenèse est conservée mais les spermatozoïdes ne sont pas excrétés dans le sperme en raison de la présence d'un obstacle au niveau des voies excrétoires (épididymes, canaux déférents, canaux éjaculateurs), les lésions peuvent être acquises ou congénitales (comme l'absence bilatérale des canaux déférents (ABCD)) (**Imade et al., 1993 ; Matzuk et Lamb 2008**).
- ✓ **Oligozoospermie** est le cas où le nombre total (ou la concentration) de Spermatozoïdes dans l'éjaculat est inférieure à la limite de référence ( $< 15 \cdot 10^6 / \text{mL}$ ) (**OMS 2010**).
- ✓ **Polyspermie** est le cas d'un nombre de spermatozoïdes qui dépasse les limites supérieures données ( $> 200 \cdot 10^6 / \text{mL}$ ). (**OMS 2010**).

- ✓ **Cryptozoospermie** : Dans ce cas les spermatozoïdes sont absents lors de l'observation microscopique de préparations fraîches, mais observés dans une pastille centrifugée (**OMS 2010**) La cryptozoospermie est sévère quand le nombre de spermatozoïdes est inférieur à 10 000 spermatozoïdes dans l'éjaculât (**Matzuk et Lamb 2008**), ou modérée quand le nombre de spermatozoïdes est situé entre 10 000 et moins de 100 000 spermatozoïdes dans l'éjaculât (**Jian Pei 2005**).

D'autres troubles qui peuvent toucher le reste de paramètres spermatiques sont présentés dans le **tableau 2**.

En pratique, chez une grande proportion d'hommes infertiles ou subfertiles on observe une association entre les différentes anomalies au niveau d'un seul échantillon spermatique, le plus souvent, il peut s'agir d'une oligoasthénozoospermie (OA), ou il ya une atteinte de nombre total des spermatozoïdes lié à un faible pourcentage des spermatozoïdes à mobilité progressive normale, ou d'une oligoasthénotérazozoospermie (OAT) qui est l'association entre une concentration spermatique inférieure a la normale, un faible pourcentage des spermatozoïdes à mobilité progressive et à morphologie typique. D'autres association peuvent se produire mais à moindre fréquences (**OMS 2010**).

**Tableau 2.** Anomalies spermiologiques selon les critères de l'OMS 2010.

paramètres	Valeurs de référence	Anomalies
Volume (mL)	< 1.5	Hypospermie
	> 6	Hyperspermie
	= 0	Aspermie
Numération (*10 <sup>6</sup> /mL)	= 0	Azoospermie
	Quelques	Cryptozoospermie
	< 5	Oligozoospermie sévère
	< 15	Oligozoospermie
Mobilité (%)	< 40	Asthénozoospermie
Morphologie (%)	< 4	Térazozoospermie
Leucocytes (*10 <sup>6</sup> /mL)	> 1	Leucospermie
Vitalité (%)	< 50	Nécrozoospermie
Autres	Présence de sang	Hémospémie
	Présence de pus	Pyospermie

## *Chapitre II*

### *Stress oxydatif et infertilité masculine*

## II.1. Définition du stress oxydatif

Dans des conditions physiologiques normales, il existe un équilibre entre la génération et l'élimination des espèces réactives à l'oxygène (ERO), il est bien établi que les ERO en quantité faible et contrôlée sont nécessaires au bon fonctionnement des cellules et interviennent dans des processus de signalisation cellulaire. En quantité excessive, ils deviennent nocifs pour la cellule et participent au processus de vieillissement, au mort cellulaire et à certaines pathologies. Certaines conditions peuvent être à l'origine d'une augmentation de la production intra et extracellulaire des ERO. Il peut s'agir de stress biotiques tels que le parasitisme, l'attaque par des agents pathogènes ou bien de stress abiotiques tels que les températures trop élevées, l'exposition aux ultraviolets ou encore les variations de disponibilité en oxygène. (**Simonian and Coyle, 1996; Madamanchi et al., 2005**).

La notion de stress oxydant est généralement définie comme un déséquilibre entre la production des radicaux libres et leur élimination par des mécanismes de protection, appelés antioxydants, ce déséquilibre conduit à des dommages importants au niveau moléculaire et cellulaire, avec un impact potentiel sur l'ensemble de l'organisme (**Durackova 2010**).

Si les ERO continuent à s'accumuler à des niveaux qui dépassent la capacité cellulaire, la cellule ne modifie pas ses propriétés biologiques. Une adaptation plus consistante de la cellule est nécessaire avec l'induction de gènes codant des enzymes antioxydantes, des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN et des protéines. On observe aussi une répression des systèmes susceptibles de libérer des ERO, notamment la chaîne respiratoire, les cytochromes P450 et la NADPH oxydase (**Barouki et Morel 2005**). Dans ce cas, nous pouvons parler de stress dans la mesure où la cellule a adapté ses fonctions biologiques, notamment son expression génique, aux modifications de son environnement. Souvent, l'induction des enzymes antioxydantes est perçue comme le révélateur de l'existence d'un stress oxydant, même si ceci a été remis partiellement en cause dans des expériences de génomique (**Desaint et al., 2004**). Dans d'autres cas, la cellule peut suivre la voie de l'apoptose ou de la sénescence.

Le stress oxydatif représente une cause bien établie de l'infertilité masculine, cela est dû au fait que la structure de la membrane spermatique est très vulnérable aux ERO vu sa richesse en acides gras polyinsaturés (AGPI) (**Agarwal et al., 2008**). La peroxydation des lipides membranaires entraîne des dommages qui retentissent sur les capacités fonctionnelles du spermatozoïde, essentiellement la mobilité et la capacité fusiogène avec l'ovocyte (**Williams et Ford 2005**). Toutes

les autres structures cellulaires sont des cibles potentielles des ERO, essentiellement l'ADN spermatique qui est également vulnérable vis-à-vis d'un stress oxydatif (**Badouard et al., 2008**).

Les effets néfastes des ERO sont équilibrés par l'action des antioxydants, le glutathion peroxydase, la catalase et le superoxyde dismutase sont les plus courantes parmi les systèmes de défense enzymatiques. De ce fait il est aisé de détecter un stress oxydant provoqué par une élévation aiguë des ERO par la mesure des espèces participant aux deux côtés de la balance. La situation est plus complexe lorsque l'on recherche un stress oxydant chronique au cours duquel, d'une part, les élévations des ERO sont atténuées par des boucles de régulation et d'autre part, les inductions des enzymes antioxydantes et réparatrices sont plus modestes, ces enzymes étant parfois elles-mêmes altérées par oxydation. (**Kodydkova et al., 2014 ; Tavidani et al., 2008**).

## II .2. Les espèces réactives à l'oxygène (ERO)

Espèces réactives à l'oxygène ou encore les dérivés actifs de l'oxygène sont des produits physiologiques du métabolisme cellulaire ayant la capacité de devenir délétères pour de nombreuses cellules, dont les spermatozoïdes s'ils augmentent dans l'environnement de la cellule, soit du fait de leur production excessive, soit d'un défaut de leur dégradation ou élimination. Le stress oxydant (SO) délétère est donc caractérisé par un déséquilibre entre la production des ERO et la capacité de l'organisme pour les détoxifier (capacité antioxydante) (**Armstrong et al., 2002 ; Agarwal and Said 2005**).

Chimiquement, les ERO sont des molécules hautement réactives et instables qui peuvent être radicalaires comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), ou le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) ou non radicalaires comme des molécules telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou l'oxygène singulier ( $1O_2$ ) (**Delattre et al., 2005**). Une espèce radicalaire R. est une espèce présentant un non appariement d'un ou de plusieurs électrons sur leurs couches externes ce qui leur confère une grande instabilité et donc elle peut modifier d'une manière oxydative les biomolécules qu'elle rencontre en leur arrachant un électron ce qui les transforme à leur tour en molécules radicalaires (**Agarwal et al., 2008**).

A faible concentration, les ERO jouent plusieurs rôles physiologiques, tels que l'induction de la réaction acrosomique et la capacitation des spermatozoïdes, mais à fortes concentrations ils ont des effets pathologiques sur les macromolécules telles que les acides gras polyinsaturés et les acides aminés (**Sharma et Agarwal 1996 ; Agarwal et al., 2003 ; Agarwal et Prabakaran 2005**).

**Tableau 03.** Quelques exemples de radicaux libres (Sanoka and kurpysz 2004).

Oxidant	Formule
Oxyde Nitrique	NO•
Dioxyde Nitrique	NO <sub>2</sub> •
Acide Hypochloreux	ClOH
Acide Hypobromeux	BrOH
Acid Hypoiodeux	JOH
Radicale Peroxyle	ROO•
Peroxyde	ROOH
Anion Superoxyde	O <sub>2</sub> •-
Peroxyde d'Hydrogène	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Radicale Hydroxyle	OH•

### II.3. Les mécanismes de défense antioxydante

L'organisme dispose de différents types de défenses antioxydantes face aux ERO générées, dans un première lieu, on trouve le système enzymatique endogène détoxifiant composé des superoxyde-dismutases (SOD), des catalases (CAT), des glutathion peroxydases (GPX), des protéines de transport des métaux (ferritine, etc...) et aussi de substances endogènes comme le glutathion (GSH) d'autre part, l'organisme possède un autre système non enzymatique ou les composés ou les molécules protectrices sont représentés par les vitamines C et E, les caroténoïdes, les polyphénols et les oligo-éléments (comme le Zn ou le Se).

Les antioxydants agissent en interrompant les réactions en chaîne aboutissant à la production des ERO. Ils peuvent être divisés en 2 sous groupes en fonction de leur mode d'action :

- i) Les antioxydants préventifs sont les métaux chélateurs et les protéines de liaison, telles que la lactoferrine et la transferrine, qui préviennent la formation des ERO;

- ii) Les antioxydants détoxifiants, tels que la vitamine C et E, qui suppriment les ERO déjà présents (**Zini et Al-Hathal 2011**).

La production incontrôlée et excessive des ERO peut être l'un des principaux facteurs associés à l'infertilité masculine. Cependant, les niveaux des ERO sont constamment conservés par un réseau d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans le fluide séminal. Etant donné que les spermatozoïdes perdent la majorité de leur cytoplasme au cours de la spermiogenèse, ils produisent des niveaux très limités d'antioxydants donc leur protection est assurée par les antioxydants présents dans le liquide séminal. Principalement trois enzymes sont présentes dans le plasma séminal, SOD, CAT et GPX/GR qui prennent une place très importante dans la protection des cellules spermatiques (**Zini et al., 1993**). Des défauts au niveau des enzymes antioxydantes ou de la capacité antioxydante totale (TAC) du plasma séminal peuvent être également à l'origine d'un excès des ERO qui conduit finalement à la destruction des spermatozoïdes. Par conséquent, le stress oxydatif (OS) est une condition qui se produit lorsque la production des ERO submerge le système de défense antioxydant.

### II.3.1. le système de défense enzymatique

#### II.3.1.1. La superoxyde dismutase

La SOD (superoxyde dismutase) est une métalloprotéine dont le rôle est de protéger l'organisme contre l'accumulation des anions superoxyde en catalysant la conversion du superoxyde en oxygène et en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Methorst et al., 2014**). De façon biochimique et moléculaire, trois isoformes de cette enzyme ont été caractérisées chez l'être humain ; la Cu/Zn-SOD ou SOD1 de localisation cytosolique et la ECSOD ou SOD3 de localisation extracellulaire, ces deux isotypes utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs nécessaires à l'activité enzymatique, alors que le troisième isotype, la SOD2, est une enzyme mitochondriale qui utilise le manganèse comme cofacteur (**Afonso et al., 2007**).

La SOD1 est une enzyme dont l'activité dépend de la présence du Cu et Zn. Bien que le cuivre soit nécessaire pour l'activité catalytique du SOD1, le Zinc participe au repliement des protéines et à la stabilité (**Peter 2015**). Le gène codant la SOD1 est localisé au niveau du chromosome 21. La SOD1 est présente dans le cytoplasme, le compartiment nucléaire, et l'espace intermembranaire mitochondrial des cellules mammifères. L'étude du promoteur du SOD1 humaine a permis de mettre en évidence plusieurs sites de fixation pour des facteurs de transcription modulés par le statut redox cellulaire, tels qu'AP-1 et NF-κB manganèse (**Afonso et al., 2007**).

La SOD 2 ou Mn-SOD est un homotétramère d'un poids moléculaire de 96 kDa et contient un atome de manganèse par sous-unité (**Said *et al.*, 2014**), elle est de localisation mitochondriale et joue un rôle important dans la protection vis-à-vis des radicaux libres induits par l'hyperoxydation. Sa déficience entraîne une augmentation de la production d'anion superoxyde mitochondrial, qui inhibe en retour la chaîne respiratoire sur les complexes I et II. Le gène du SOD2, est situé sur le chromosome 6. (**Morten *et al.*, 2006**).

La SOD3 ou superoxyde dismutase extracellulaire (EC-SOD) est un antioxydant dont le gène se situe au niveau du chromosome 4, elle est présente dans les compartiments extracellulaire (plasma, lymphe, fluide cérébrospinal, et liquide synovial) et catalyse la dismutation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et de l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) (**Fattman *et al.*, 2003 ; Gottfredsen *et al.*, 2014**). Cette enzyme possède une forte affinité pour l'héparine et d'autres protéoglycannes de la matrice extracellulaire et de la membrane plasmique (**Afonso *et al.*, 2007**). Les analyses structurales montrent que la Cu / Zn-SOD et le site actif de EC-SOD ayant les mêmes plis mais avec quelques différences mineures dans les structures en boucle (**Antonyuk *et al.*, 2009**). Les résidus d'acides aminés impliqués dans la coordination de l'atome de cuivre et l'atome de zinc sont conservés et partagent des orientations spatiales à peu près identiques, supportant la constatation que les propriétés enzymatiques de ces enzymes sont comparables (**Gottfredsen *et al.*, 2014**).

EC-SOD est la seule enzyme antioxydante qui piège les superoxydes en particulier dans l'espace extracellulaire. Le profil d'expression de cette enzyme est très limité au type cellulaire et aux tissus particuliers où son activité peut être supérieure à celle de Cu, Zn-SOD ou Mn-SOD (**Peter F Surai 2015**). Comme une enzyme contenant du cuivre, l'activité d'EC-SOD est régulée par la disponibilité de cet oligoélément (**Nozik-Grayck *et al.*, 2005**). L'isotype SOD3 démontre une activité séminale élevée avec 25% de l'activité totale de cette enzyme (**Walczak-Jedrzejowska *et al.*, 2012**).

Un rôle clé de la SOD dans la protection des cellules testiculaires contre l'apoptose induite par un stress thermique a été démontrée in vivo et in vitro (**Ikeda *et al.*, 1999 ; Kumagai *et al.*, 2002**). La SOD empêche également l'hyper-activation prématurée et la capacitation induite par les radicaux superoxydes avant l'éjaculation (**De Lamirande et Gagnon 1995**).

Des études ont montré que les souris mâles transgéniques exprimant des niveaux élevés de MnSOD sont infertiles, mais le mécanisme est inconnu. ECSOD est présente à des niveaux élevés

dans l'épididyme (**Mruk et al., 2002**), elle est localisée dans les noyaux et dans les tubules séminifères des testicules (**Ookawara et al., 2002**). Des chercheurs ont prouvé que la fonction érectile est améliorée en transférant le gène SOD3 au pénis chez les rats âgés (**Bivalacqua et al., 2003**).

Donc la famille de superoxyde dismutase (SOD) piège à la fois les anions superoxydes au niveau extracellulaire et intracellulaire et empêche la peroxydation des lipides de la membrane plasmique (**Agarwal et Prabakaran 2005**). Dans le but d'agir contre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, elle doit être conjugué avec la catalase ou le glutathion peroxydase (**Jeulin et al., 1989**).

### II.3.1.2. Le glutathion peroxydase

Le GPX est une enzyme qui contient un seul résidu de sélénocystéine (Sec) dans chacune des quatre sous-unités identiques, qui sont essentiels à l'activité de l'enzyme (**Carlos Clayton et al., 2012**). Elle joue un rôle central dans la détoxification des peroxydes en utilisant la forme réduite de glutathion (GSH) comme donneur d'électrons. Il existe quatre sous-espèces de GPX qui catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène dans des emplacements spécifiques des tissus (**Arthur 2000 ;Imai et Nakagawa 2003**). GPX1 est ubiquitaire et trouvée dans le cytosol de la plupart des cellules, y compris les globules rouges (hématies) (**Sara et al., 2008**). Le GPX2 est également cytosolique mais se limite au tractus gastro-intestinal. Le GPX3 est une enzyme extracellulaire qui se trouve dans le plasma sous forme d'une glycoprotéine, et le GPX4 interagit avec les lipides complexes, tels que le cholestérol et les lipoprotéines endommagés par les radicaux libres, et on le trouve dans les mitochondries (**Imai et Nakagawa 2003**).

GPX1, GPX2 et GPX3 sont des homotétramères alors que le GPX4 est un monomère ayant une taille moléculaire inférieure à celle des sous-unités des autres glutathion peroxydases (**Carlos Clayton et al., 2012**). En raison de leur petite taille et de leur surface hydrophobe, les GPX4 ont la capacité de réagir avec des lipides complexes dans les membranes (**Malinska et al., 2010**).

Le GPX4 est une protéine structurale qui est essentielle pour la formation normale de l'enveloppe mitochondriale et constitue environ 50% des protéines de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes un contenu localisé dans l'hélice mitochondriale (**Ursini et al., 1999**). La nécessité de GPX4 pour assurer un fonctionnement normal des spermatozoïdes a été également démontrée chez l'homme car des études montrent que les hommes infertiles ont une faible motilité des spermatozoïdes avec une morphologie anormale (**Imai et al., 2001**). Il est important de souligner que ce qui est pertinent, c'est bien la capacité de GPX4 d'interagir avec des hydroperoxydes pour

former l'enveloppe de la mitochondrie lors de la spermiogénèse, et non son activité antioxydante qui est inférieure à 3% de la teneur totale en protéines dans les spermatozoïdes éjaculé (**Ursini et al., 1999**).

Le rôle du GPX1 dans les spermatozoïdes humain est controversé parce que dans de nombreuses études l'activité de GPX1 a été mesurée à l'aide d'hydroperoxyde de cumène et le NADPH (**Garrido et al., 2004**); des substrats qui sont également utilisés par d'autres enzymes telles que peroxyrédoxines (**O'Flaherty 2014 b**). Jusqu'à présent, il n'y a pas de rapport démontrant la présence de GPX1 dans les spermatozoïdes. Il semble que le rôle de GPX1 comme une enzyme antioxydante importante est discutable car les mâles GPx1 - / - sont fertiles et ils ne sont pas sensibles au stress oxydatif (**Ho et al., 1997**), et la peroxydation lipidique n'est pas augmentée dans les spermatozoïdes humains mis en incubation avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de carmustine (inhibiteur de la glutathion réductase (GR)) ou le maléate de diéthyle (se lie à la GSH rendant non accessible pour le système GPX /GR) qui affecte l'activité du système GPX / GR (**O'Flaherty 2014 a**). En outre, la présence de GPX dans le plasma séminal a été démontrée depuis presque 20 ans (**Yeung et al., 1998**).

### II.3.1.3. La Catalase

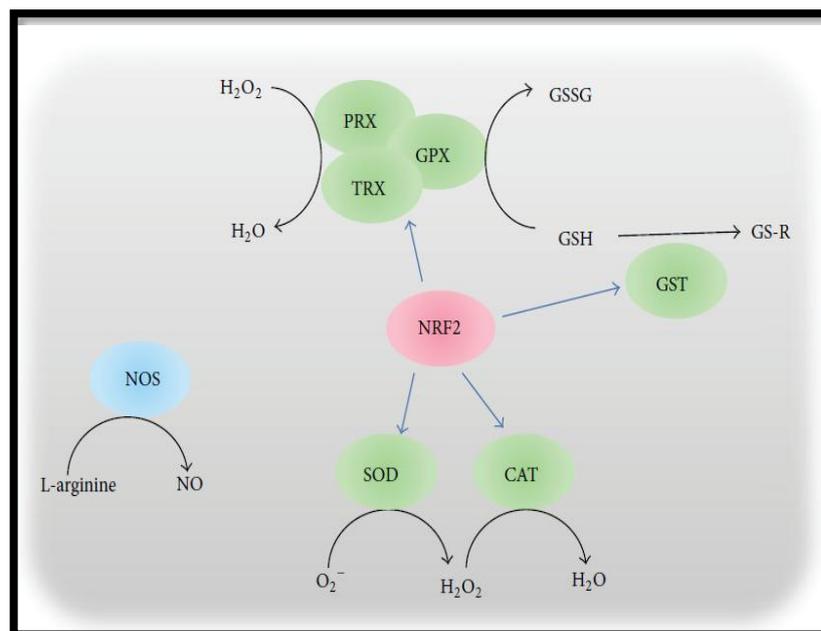
La Catalase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxydoréductase) est un tétramère de quatre chaînes polypeptidiques, chacun contient plus de 500 acides aminés, et un groupement hème porphyrine (fer) qui permettent à l'enzyme de réagir avec le peroxyde d'hydrogène (**Boon et al., 2007**). La catalase peut décomposer le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dans des réactions catalysées par deux modes d'activités enzymatiques différents: le mode d'activité catalytique (2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → O<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub>O) et le mode d'activité peroxydatif (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + AH<sub>2</sub> → A + 2H<sub>2</sub>O). La Catalase a l'un des taux de roulement les plus élevés de toutes les enzymes; une molécule de catalase peut convertir des millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène par seconde (**Goodsel 2007**). La Décomposition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'activité catalytique de la catalase suit la manière d'une réaction de premier ordre et son taux dépend de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Valko et al., 2007**).

L'activité de la catalase (CAT) a été démontrée dans les peroxysomes, les mitochondries, le réticulum endoplasmique et dans le cytosol de nombreux types des cellules (**Scibior et al., 2006 ; Walczak-Jedrzejowska et al., 2012**). Dans le sperme, il a été trouvé dans les cellules de spermatozoïdes de l'être humain et le rat, ainsi que dans le plasma séminal, où la source est la prostate (**Fraczek et Kurpisz 2005**). La catalase active la capacitation des spermatozoïdes induite

par l'oxyde nitrique, qui est un mécanisme compliqué utilisant le peroxyde d'hydrogène (**de Lamirande et al., 1997**).

**Tableau 4.** Antioxydants enzymatiques majeurs impliqués dans la spermatogenèse (**Yu et Hunag 2015**)

Enzyme	Name	Isoforms in human
NRF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	NRF2
SOD	Superoxide dismutase	SOD1, SOD2, SOD3
CAT	Catalase	CAT
NOS	Nitric oxide (NO) synthase	NOS-1, NOS-2, NOS-3
GST	Glutathione S-transferase	GSTA1-GSTA5, GSTZ1, GSTM1-GSTM5, GSTO1-GSTO2, GSTP1, GSTT1-GSTT4
PRX	Peroxyredoxin	PRX1-PRX6
GPX	Glutathione peroxidase	GPX1-GPX8
TRX	Thioredoxin	TRX1, TRX2



**Figure 1.** Interactions entre les principaux antioxydants impliqués dans la spermatogenèse (**Yu et Huang, 2015**). NRF2 assure la régulation de l'expression de plusieurs enzymes antioxydantes ; Peroxydoxine (PRX), Thiorédoxine (TRX), Glutathione peroxydase (GPX), Glutathione S-transférase (GST), Superoxyde dismutases (SODs) et Catalase (CAT). La forme principale d'ERO est l'anion Superoxyde ( $O_2^-$ ) qui peut être converti en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par l'action des SODs.  $H_2O_2$  pourrait être catalysé en  $H_2O$  par CAT, GPX ou bien PRX. GST catalyse la conjugaison du Glutathione réduit (GSH) en substrats Xenobiotics. Oxyde nitrique synthétases (NOSs) catalysent la production de l'oxyde nitrique (NO) à partir de L-arginine.

### II.3.2. Le système de défense non-enzymatique

A coté des enzymes qui neutralisent la production excessive des ERO, des molécules autres qu'enzymatiques de faibles poids moléculaire réagissent directement avec les radicaux libres pour générer ainsi des radicaux plus stables.

#### II.3.2.1. La vitamine E

C'est un antioxydant liposoluble qui a la plus grande concentration cellulaire (**Meydani 1995**). Elle exerce sa capacité antioxydante en inactivant les ERO et en piégeant les radicaux libres devenant elle-même un radical non toxique. La supplémentation en vitamine E a montré des résultats significatifs sur la numération, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes (**Eskenazi et al., 2005**) ainsi que sur de la fragmentation de l'ADN (**Greco et al., 2005**). Elle va donc avoir un effet direct sur la qualité du sperme (**Faure et al., 2011**). L'excès de vitamine E dans l'alimentation conduit à l'augmentation de la concentration  $\gamma$ -tocophérol dans le sperme qui, à son tour, a une influence négative sur les paramètres spermatiques : diminution du nombre total de spermatozoïdes et augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux (**Danikowski et al., 2002**).

#### II.3.2.2. La vitamine C

Ou l'acide L- ascorbique, est considérée comme l'antioxydant le plus important dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très puissant des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et pyroxyles et de l'oxygène singulet. Elle agit en régénérant la vitamine E. In vivo, elle est maintenue sous forme réduite par l'action de la déshydroascorbate réductase qui utilise le glutathion comme cofacteur (**Berliner et Heineche 1996**). La vitamine C est une molécule facilement oxydable, elle est considérée comme un excellent piègeur des ERO ( $\text{HO}\cdot$  ou  $\text{O}_2\cdot^-$ ) qui va donc jouer un rôle d'antioxydant majeur pour les spermatozoïdes (**Haleng et al., 2007 ; Faure et al., 2011**). Les effets bénéfiques d'une supplémentation en vitamine C résulteraient de l'élimination des radicaux libres (diminution de la 8-oxoDG dans les spermatozoïdes, marqueur de l'oxydation, et diminution de la peroxydation) (**Sonmez et al., 2005**). De plus, l'acide ascorbique active à la fois la FSH et la LH, qui vont, à leur tour, stimuler la spermatogenèse et, par conséquence, augmente la concentration en spermatozoïdes. Enfin, l'élévation de la concentration de la vitamine C, dans le sang et donc dans le sperme, entraîne aussi une élévation de la concentration en testostérone (stimulation de l'activité de stéroïde-déshydrogénase) dans le sang, améliorant ainsi la fertilité (**Biswas et al., 1996**).

### II.3.2.3. La vitamine A

Elle est essentielle pour la fertilité masculine. Elle induit la production de testostérone, joue un rôle indispensable dans le maintien des jonctions serrées dans les cellules de Sertoli contribuant à la barrière hémato-testiculaire (**Morales et Cavicchia., 2002**). La carence en cette vitamine induit l'arrêt de la spermatogenèse au stade prophase de la méiose ; la sévère déplétion des cellules germinales qui en découle, entraîne un taux élevé de FSH dans le sérum des rats carencés. Ces effets sont réversibles par une renutrition en vitamine A. La vitamine A est donc indispensable à la fertilité masculine, mais aussi, à fortes doses, peut s'avérer délétère (**Faure et al., 2011**).

### II.3.2.4. La carnitine

Elle a un rôle d'antioxydant protégeant contre les ERO (**Vicari et al., 2002**). elle assiste le métabolisme du spermatozoïde comme source d'énergie et intervient dans sa mobilité et sa maturation (**Palmero et al., 2000**). Il est démontré qu'il existe une corrélation significative entre la concentration en carnitine dans le plasma séminal et la concentration spermatique, la mobilité, l'intégrité de l'ADN et la capacité de pénétration de la glaire cervicale des spermatozoïdes (**De Rosa et al., 2005**). Les deux principales formes de carnitine sont la L carnitine (LC) et la L acétylcarnitine (LAC) (**Agarwal et Said 2004**). De nombreuses études qui s'intéressent à la supplémentation en carnitine pour des hommes infertiles, elle montrent l'effet bénéfique de cette dernière sur la fertilité masculine. Les suppléments en LC ou en LAC semblent avoir le même effet (**Zhou et al., 2007**), et il est établi qu'après quelques mois de supplémentation en carnitine, une augmentation de la mobilité et du nombre de spermatozoïdes est observée (**Garolla et al., 2005**).

### II.3.2.5. Le zinc

C'est un composant structurel et / ou fonctionnel de nombreux métalloenzymes et des métalloprotéines (**Coleman 1992**). Elle est impliquée dans le système immunitaire (**Fraker et al., 2000**), la croissance et la prolifération cellulaire (**MacDonald 2000**), la réplication et la transcription de l'ADN (**Wu Fy et wu 1987**). En outre, le zinc est important pour la reproduction en raison de son rôle essentiel dans le développement des cellules germinales (**Bedwal et Bahuguna 1994**). Le zinc a également des propriétés antioxydantes (**Zago et Oteiza 2001**), pour laquelle trois mécanismes possibles ont été décrits, i) par l'intermédiaire de synthèse de métallothionéine, qui inhibe les réactions de propagation des radicaux libres (**Maret 2000**); agissant en tant que composant structurel et catalytique de la SOD, ce qui réduit la toxicité des espèces réactives de l'oxygène, ii) en catalysant la dismutation du O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> (**Ferreira et Matsubara 1997**),

et iii) empêchant l'oxydation en se liant au sulfhydryle (SH) dans les protéines de la membrane cellulaire en occupant les sites de liaison du fer et du cuivre, qui sont des pro-oxydants (**Zago et Oteiza., 2001**).

#### **II.4. Implication du stress oxydatif dans la physiologie et la physiopathologie de l'infertilité masculine**

Bien que la présence des radicaux libres dans le sperme et les spermatozoïdes est rapportée depuis plus de 70 ans par **McLeod (1943)**, leur rôle et implication dans la physiologie de la reproduction masculine n'a été observé qu'en 1989 (**Aitken 1989**). Actuellement, il est bien connu que des niveaux faibles et physiologiques d'ERO sont nécessaires pour les fonctions normales de spermatozoïdes comme la motilité, la capacitation, l'hyperactivation, la réaction acrosomique, la fusion avec l'ovocyte et la fertilisation (**Griveau et Lannon 1997 ; Agarwal et al., 2004**). Et pour assurer leur fonctionnement normal, les spermatozoïdes produisent eux même les ERO nécessaires.

Toutefois, plusieurs paramètres endogènes et exogènes peuvent contribuer à un excès de production des ERO ce qui affecte négativement la fonction du sperme (**Aitken et Clarkson 1988 ; Taylor and Turnbull 2005**). Le mécanisme derrière cet effet est l'induction de la peroxydation lipidique des membranes plasmiques de spermatozoïdes (**Baker et Aitken 2005**), ce qui affecte la fluidité membranaire, la perméabilité et la mobilité. En outre, les ERO peuvent également inhiber la fonction mitochondriale et affecter la synthèse de l'ADN, l'ARN et des protéines (**De Lamira et Gagnon 1992**).

##### **II.4.1. Rôles physiologique des ERO dans la fertilité de l'homme**

###### **➤ Capacitation et hyperactivation**

La capacitation est l'avant-dernier processus dans la maturation des spermatozoïdes, elle est nécessaire pour les rendre compétents pour fertiliser avec succès l'ovocyte (**Choudhary et al., 2010**). La première étape de la capacitation implique une augmentation d'adénosine cyclique 3', 5'-monophosphate cyclique (AMPC). La voie de l'AMPC est nécessaire pour de nombreux organismes vivants et elle peut activer des enzymes et réguler l'expression de plusieurs gènes (**Tsai et al., 2013**). Cette augmentation de l'AMPC provoque une hyperactivation du spermatozoïde, seulement les spermatozoïdes hyperactivés peuvent augmenter leur motilité pour subir une réaction acrosomique et pour acquérir les caractéristiques requises pour réussir la fécondation (**Agarwal et al., 2014**).

L'hyperactivation est un état spécifique de la motilité des spermatozoïdes ; c'est lorsque les spermatozoïdes deviennent très mobiles, les spermatozoïdes hyperactifs présentent une grande amplitude et des mouvements flagellaires asymétriques. Le processus d'hyperactivation est essentiel pour la fécondation et est considéré comme une sous-catégorie de capacitation (**Agarwal et al., 2014**).

Le rôle des ERO dans l'initiation de l'hyperactivation a été bien documenté in vitro. Dans l'étude de **Makker et al. (2009)**, lorsque des spermatozoïdes ont été incubés avec des faibles concentrations de OH<sup>-</sup>, une hyperactivation des ces derniers est observée.

#### ➤ **La réaction acrosomique**

Une fois que le spermatozoïde hyperactivé passe le cumulus oophorus, il se lie à la zone pellucide (ZP) de l'ovocyte et initie une libération par exocytose des enzymes protéolytiques, ce qui crée des pores dans la matrice extracellulaire de la ZP (**Agarwal et al., 2014**). Les spermatozoïdes pénètrent ensuite cette barrière physique, zone pellucide, et fusionnent avec l'ovocyte (**de Lamirande et O'Flaherty 2008**). Les événements moléculaires de la réaction acrosomique se chevauchent sensiblement avec ceux de la capacitation, y compris la phosphorylation des protéines tyrosine, le flux de Ca<sup>2+</sup> et l'augmentation des taux d'AMPc et PKA.

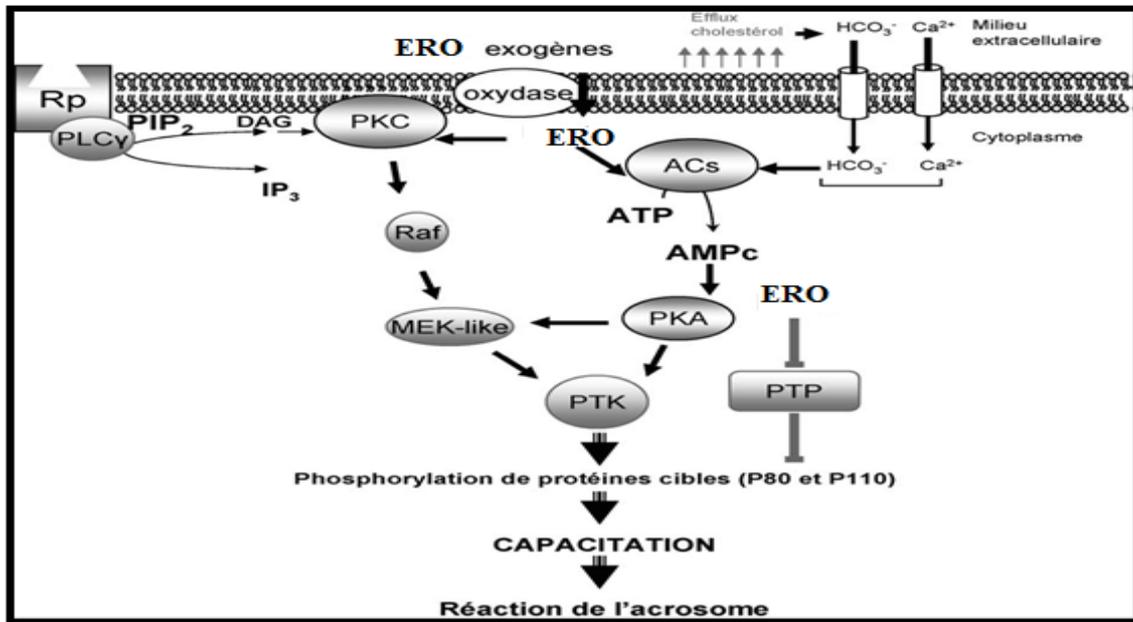
Le rôle des ERO dans la réaction acrosomique in vivo implique les actions des spermatozoïdes sur la ZP via la phosphorylation de trois protéines de la membrane plasmique. L'activation in vitro de la réaction acrosomique a également été observée lorsque des concentrations physiologiques d'O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et NO sont ajoutés au plasma séminal (**Bansal et Bilaspuri 2011 ; Agarwal et al., 2014**).

#### ➤ **fusion spermatozoïde-ovocyte**

Pour réussir la fécondation, le spermatozoïde doit pénétrer la ZP et fusionne avec l'ovocyte. Des quantités élevées des AGPI, en particulier l'acide docosahexaénoïque (DHA), jouent un rôle majeur dans la régulation de la fluidité membranaire dans le sperme. Des études sur les spermatozoïdes humains ont montré que les ERO augmentent la fluidité de la membrane et le taux de fusion spermatozoïde-ovocyte (**Ghareeb et Sarhan., 2014**).

Tout au long de la capacitation les ERO inhibent l'activité de la protéine tyrosine phosphatase et empêchent la déphosphorylation et l'activation de la phospholipase A2 (PLA2) (**Agarwal et al., 2014**). La PLA2 Clive les acide gras secondaire à partir du squelette du triglycéride

du phospholipide membranaire et augmente la fluidité de la membrane cytoplasmique (Khosrowbeygi et Zarghami., 2007).



**Figure 02.** Représentation simplifiée des voies de signalisation affectées par les ERO (Pons-Rejraji *et al.*, 2009).

Les ERO peuvent être générés par les spermatozoïdes ou être apportés par une source exogène. Ils activent les voies de signalisation intracellulaire de la capacitation impliquant, d'une part, l'adénylate cyclase (AC), l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) et, d'autre part, les MEK-like kinases (« Mitogen-activated protein » extracellular signal regulated kinases) via la protéine kinase C (PKC) et la protéine Raf. Ces deux voies conduisent à la phosphorylation sur des résidus tyrosines des protéines P110 et P80 par le jeu de l'activité des protéines tyrosines kinases (PTK) et des protéines tyrosines phosphatases (PTP). Les DAO inhiberaient également directement des PTP, empêchant la phosphorylation des protéines cibles. Rp : récepteur membranaire ; PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PLCg : phospholipase Cg ; IP3 : inositol triphosphate et DAG : diacylglycérol.

#### II.4.2. Effets pathologiques délétères des ERO sur la fertilité masculine

Les spermatozoïdes ont une faible activité transcriptionnelle et un volume cytoplasmique réduit. Ils sont incapables de répondre à un stress oxydant en produisant de novo des anti-oxydants ou en réparant le matériel cellulaire altéré. Même si certains antioxydants sont présents dans les spermatozoïdes, le liquide séminal reste la meilleure protection des spermatozoïdes contre les ERO.

Lorsque les ERO surpassent les systèmes de défense antioxydants et perturbent l'équilibre entre ERO et antioxydants, les anomalies pathologiques se produisent selon la nature, la quantité des ERO et la durée de leur impact. Leurs conséquences sont la peroxydation lipidique, la dégradation des protéines et la fragmentation de l'ADN (Methorst *et al.*, 2014).

#### **a. La peroxydation des lipides**

Les lipides sont présents dans la membrane plasmique des spermatozoïdes sous forme d'acides gras polyinsaturés, ils sont considérés comme les macromolécules les plus sensibles à la peroxydation. Ces lipides contiennent plus de deux doubles liaisons carbone-carbone (Tvrdá *et al.*, 2011). Ces acides gras maintiennent la fluidité des membranes spermatiques (Agarwal et Saleh 2002). Les ERO attaquent les AGPI, conduisant à une cascade de réactions chimiques appelée peroxydation des lipides (Makker *et al.*, 2009). La peroxydation des AGPI se traduit par la perte de fluidité de la membrane et une réduction de l'activité des enzymes membranaires et des canaux ioniques (Tvrdá *et al.*, 2011). En conséquence, les mécanismes cellulaires normaux qui sont nécessaires pour la fécondation sont inhibés (Agarwal et Allamaneni, 2006).

La peroxydation des lipides dans les spermatozoïdes est une réaction d'auto-propagation, sauf si contrecarrée par les antioxydants séminaux (Tvrdá *et al.*, 2011). Une fois que les ERO agissent sur les lipides membranaires, les radicaux alkyle et peroxyde lipidiques sont formés. Ces radicaux, si non trempés par les antioxydants, vont agir sur d'autres lipides dans la membrane jusqu'à ce que tous les lipides subissent des dommages de peroxydation (Agarwal et Saleh 2002).

#### **b. Atteinte de l'intégrité de l'AND spermatique**

La chromatine des spermatozoïdes humains a une structure très condensée et organisée. Au cours du processus de la spermiogénèse, la chromatine spermatique subit une série de modifications qui aboutit à la compaction de l'ADN qui rend le spermatozoïde particulièrement résistant aux dommages (Schulte *et al.*, 2010). Toutefois, dans certains cas où la compaction est médiocre et la protamination de la chromatine est incomplète, l'ADN est plus vulnérable au stress oxydant. Des cassures simples et double-brins de l'ADN résultant de l'action d'ERO ont été observées dans les spermatozoïdes humains testiculaires et épидидymaires (Kemal *et al.*, 2000).

Lorsque l'ADN est faiblement endommagé, il peut être réparé et le spermatozoïde retrouve sa capacité de féconder l'ovocyte. Et dans les cas où les mécanismes de réparation par l'ovocyte ne suffisent pas, l'embryon peut échouer à se développer ou à s'implanter dans l'utérus. On estime que 80 % des aberrations chromosomiques sont d'origine paternelle (González-Marín *et al.*, 2012). Les

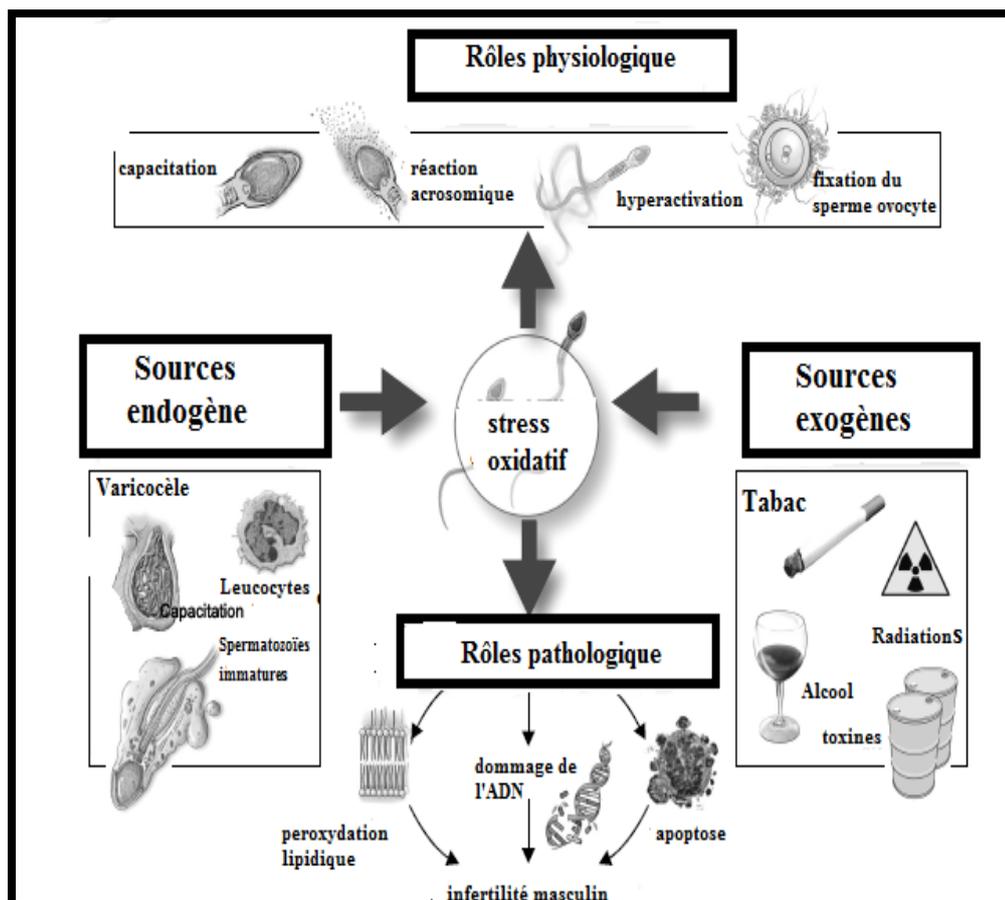
dommages sur l'ADN sont aussi considérés comme des facteurs contribuant à l'apoptose (Aitken et Koppers., 2011).

### c. Apoptose

L'apoptose, également connue sous le nom de la mort cellulaire programmée, est un phénomène physiologique caractérisé par des modifications morphologiques et biochimiques cellulaires qui aboutissent à la mort des cellules de façon commandée. Il a été observé que les spermatozoïdes des patients infertiles présentant les niveaux augmentés d'ERO avaient des taux sensiblement plus élevés d'apoptose que les spermatozoïdes du groupe contrôle (Agarwal et Said 2003).

### d. Dégradation des paramètres du sperme

La production excessive d'ERO est associée à une diminution de la mobilité, de la concentration des spermatozoïdes et à une atteinte de leur morphologie. Ces paramètres sont les principaux paramètres corrélés avec la fertilité masculine (Methorst *et al.*, 2014).



**Figure 03.** Rôle physiologiques et pathologiques du stress oxydatif dans la fertilité masculine (Agarwal *et al.*, 2014).

## II.5. Etiologies du stress oxydatif et origine des ERO

Il existe un très grand nombre de facteurs endogènes et exogènes qui peuvent être à l'origine d'un stress oxydatif qui touche le potentiel de fertilité masculine. Les ERO du plasma séminal proviennent de diverses sources intrinsèques telles que les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les cellules germinales immatures tandis que les principaux facteurs extrinsèques sont le tabagisme, la consommation d'alcool et les polluants environnementaux (**Methorst et al., 2014**).

### II.5.1. Sources endogène des ERO

#### a. Leucocytes

Les leucocytes du sperme sont des polynucléaires (50 % à 60 %) et des macrophages (20 % à 30 %) (**Saleh et al., 2003**). Une large proportion de ces leucocytes peroxydase-positifs proviennent de la prostate et des vésicules séminales. Sous l'action de divers stimulus intracellulaires ou extracellulaires de nature inflammatoire, ils peuvent décharger jusqu'à 100 fois plus de ERO qu'habituellement (**Agarwal et al., 2003**) et sont à l'origine de la production d'une quantité d'ERO 1000 fois plus importante que celle produite par les spermatozoïdes (**Plante et al., 1994**). Cette forte production d'ERO par les leucocytes joue un grand rôle dans la protection de l'organisme contre les infections, l'inflammation et les mécanismes de défense cellulaire. Chez les cellules spermatiques, c'est une nécessité physiologique aux leucocytes de libérer ces grandes quantités de superoxyde en vésicules phagocytaires au cours de l'action destructrice des Pathogènes (**Henkel, 2011**).

Alors dans le cas d'une concentration normale de leucocyte dans le sperme (inférieure à 1 million de cellules peroxydases positives par millilitre de sperme), les leucocytes ne présentent aucun effet pathologique, mais quand cette concentration dépasse  $10^6$ /mL, ces cellules génèrent un stress oxydant capable d'endommager les spermatozoïdes.

Plusieurs études ont montré une corrélation entre un sperme altéré et des niveaux anormalement élevés d'ERO, d'IL-6 (interleukine 6), d'IL-8 (interleukine 8) et des TNF (tumor necrosis factor) (**Nandipati et al., 2005 ; Lavranos et al., 2012**).

#### b. Spermatozoïdes immatures

Au cours de la spermatogenèse, les spermatides allongées perdent physiologiquement leur cytoplasme, condition nécessaire pour qu'ils obtiennent leurs formes condensées et allongées et acquièrent un pouvoir fécondant. Cependant, quelques cellules spermatiques peuvent conserver un excès de cytoplasme autour de la pièce intermédiaire. On parle d'excès de cytoplasme résiduel (ECR).

Les ECR sont riches en glucose-6-phosphate déshydrogénase, une enzyme qui contrôle la vitesse du flux du glucose et la production intracellulaire de b-nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) à travers les hexoses monophosphate. Le NADPH est utilisé pour alimenter la génération d'ERO par l'intermédiaire de la NADPH oxydase situé à l'intérieur de la membrane spermatique (El-Tohamy 2012 ; Rengan *et al.*, 2012). Donc il est bien clair que La capacité des spermatozoïdes à produire des ERO est inversement liée à leurs états de maturation.

### c. Varicocèle

La varicocèle est définie par la présence d'une dilatation variqueuse du plexus pampiniforme antérieur du testicule (Muratorio *et al.*, 2013). Une varicocèle est détectée chez environ 40 % des hommes consultant pour une infertilité, elle est considérée comme une cause importante d'infertilité masculine (Will *et al.*, 2011). Il a été démontré que le niveau d'ERO séminal est positivement corrélé avec la varicocèle, et que le stress oxydatif est évoqué comme un facteur induisant des altérations spermatiques observées en présence de varicocèle, car plusieurs études ont montré que la production de radicaux libres est plus importante chez les patients qui présentent cette anomalie (Nallella *et al.*, 2004 ; Agarwal *et al.*, 2008a ; Agarwal *et al.*, 2009).

## II.5.2. Sources exogènes des ERO

### a. Radiations

Les ondes électromagnétiques peuvent affecter négativement le flux d'électrons le long de la membrane interne de la cellule, perturbant ainsi le fonctionnement cellulaire normal (La Vignera *et al.*, 2012). Plusieurs études ont mis en cause les radiations émises par les téléphones mobiles dans l'augmentation de la production de ERO dans le sperme humain, avec un impact significatif sur la qualité du sperme (Agarwal *et al.*, 2008b ; Aitken *et al.*, 2005). Des études *in vitro* ont montré que le rayonnement électromagnétique peut induire une production des ERO, endommagement de l'ADN des spermatozoïdes humains et cause une diminution de la mobilité et la vitalité et la concentration des spermatozoïdes en fonction de la durée d'exposition aux rayonnements (De Iuliis *et al.*, 2009).

### b. Les toxines et les métaux lourds

De nombreux auteurs ont signalé l'effet nocif des facteurs toxiques présents dans notre environnement sur la fonction sexuelle. On peut citer entre autre le gaz d'échappement d'origine automobile; le tabac; le cadmium; le plomb; le chrome, le manganèse et le mercure (Benoffs *et al.*, 1997 ; Sepaniak *et al.*, 2004 ; Aitken *et al.*, 2006 ; Kiziler *et al.*, 2007). De même, des molécules

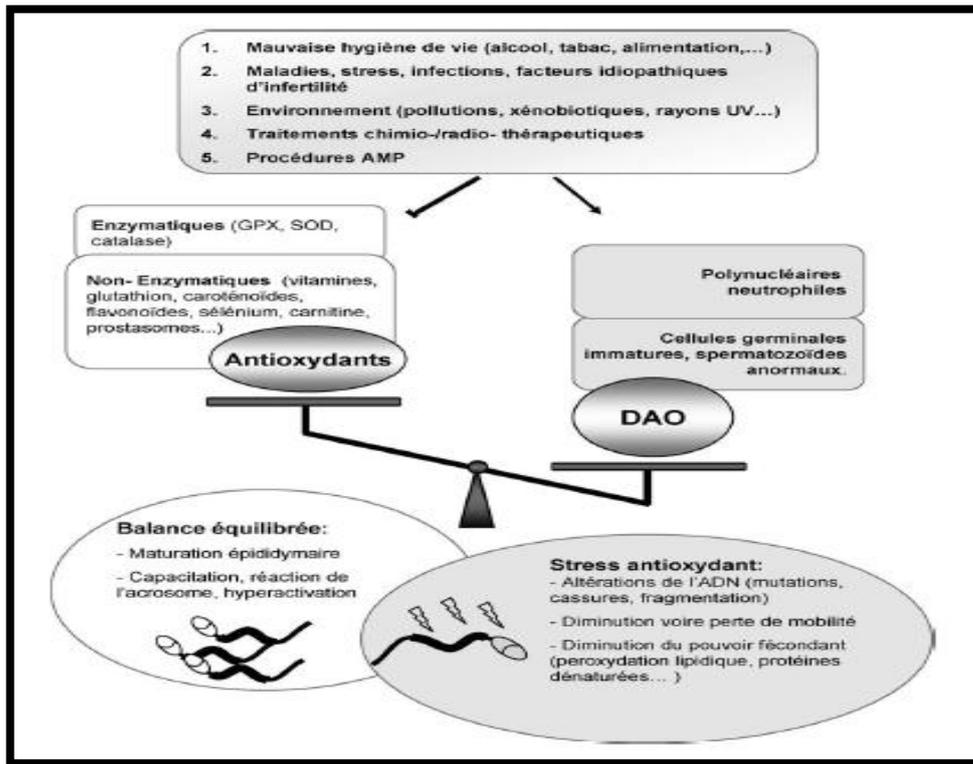
toxiques libérées par les produits industriels peuvent augmenter la production d'ERO dans les testicules, notamment les phtalates présents dans de nombreux objets en plastique utilisés à des fins domestiques et industrielles (**Pant et al., 2008**), ce qui peut altérer la spermatogénèse et endommager l'ADN du spermatozoïde (**Kasahara et al., 2002**).

L'exposition aux xénobiotiques présents dans ou à proximité de notre alimentation (insecticides, pesticides, phtalates), sont des sources de stress oxydant pouvant affecter la fertilité (**Aitken et al., 2006**).

### c. Tabac

Si la relation tabac-hypofertilité reste encore controversée, les différentes équipes s'accordent toutes sur l'existence d'un stress oxydatif lié à des mécanismes physiopathologiques générés par la fumée de cigarette (**Sepaniak et al., 2004**). Les cigarettes contiennent plus de 4000 substances chimiques, dont certaines peuvent causer un déséquilibre entre ERO et antioxydants dans le sperme des fumeurs. Par exemple, le sperme et le sang des fumeurs contiennent des concentrations de cadmium et de plomb plus élevées, qui s'accompagne d'une production accrue d'ERO et d'une diminution de la mobilité des spermatozoïdes (**Kiziler et al., 2007**).

Le tabagisme peut entraîner une augmentation de 48 % de la concentration des leucocytes et de 107 % des ERO au niveau du plasma séminal (**Saleh et al., 2002a**). De plus, la cigarette elle-même contient de nombreux radicaux libres comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux hydroxyles (**Church et al., 1990**), qui viennent ajouter leur action à celle des leucocytes. En fin il est démontré que les spermatozoïdes des fumeurs sont beaucoup plus sensibles à la dénaturation de l'ADN que ceux des non-fumeurs, avec des niveaux plus élevés de ruptures de brins d'ADN (**Jarow., 2003**).



**Figure 04.** Résumé de l'équilibre entre la production d'ERO et les systèmes antioxydants du sperme. La balance pro-oxydants/antioxydants schématise l'équilibre dans le sperme entre la production de ERO et les systèmes de défense antioxydants. Les ERO sont indispensables à l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes, toutefois en excès, ils provoquent des dommages importants sur la cellule. De nombreux facteurs endogènes et exogènes peuvent induire une surproduction d'ERO ou un déficit en antioxydants, entraînant une rupture de cet équilibre. Cette situation est qualifiée de stress oxydant. AMP: Assistance médicale à la procréation ; DAO : dérivés actifs de l'oxygène (Pons-Re jraji *et al.*, 2009).

## II.6. Marqueurs biologiques du stress oxydatif et leur mesure dans le plasma séminal

L'évaluation du statut oxydatif peut être réalisée aux différents niveaux et par une diversité de techniques. D'une part, le dosage des molécules biologiques modifiées, telles que les protéines oxydées et les dérivés de la peroxydation lipidique, et d'autre part, le potentiel antioxydant peut également être apprécié par la détermination des activités enzymatiques du superoxyde dismutase (SOD), du glutathion peroxydase (GPX) et de la catalase. Ces enzymes représentent la principale ligne de défense au même titre que les éléments non protéiques comme le glutathion réduit (GSH) et les micronutriments antioxydants (Vitamines, Sélénium, etc...) dont la mesure peut également être effectuée.

Il est possible de mesurer des radicaux libres directement par une technique bien connue par les chimistes ; la résonance para électronique (ESR ou RPE) (**Favier et al., 1995**). Malheureusement, cette technique n'est pas très sensible et, surtout, la demi-vie courte des radicaux libres de l'oxygène est incompatible avec le temps de réalisation d'un prélèvement et son dosage (**Favier et al., 1997**).

Il est néanmoins possible de détecter par RPE des radicaux secondaires de type pyroxyde (**Coghlan et al., 1991**) ou de type ascorbyle (**Pietri et al., 1994**), mais il est indispensable d'utiliser un agent stabilisant les radicaux libres (dit agent *spin trap*) et de congeler le prélèvement immédiatement dans l'azote liquide (**Favier et al., 1997**).

Le plus souvent, les chercheurs ont recouru à la chimiluminescence qui utilise la lumière produite par réaction des radicaux libres avec des sondes lucigéniques comme le luminole ou la lucigénine. Le luminole n'est pas spécifique et peut produire de la lumière en réagissant avec de nombreuses biomolécules comme les peroxydes ou l'acide urique. L'application la plus courante de cette technique est la mesure des radicaux produits par des cellules isolées du sang (polynucléaires neutrophiles, monocytes, lymphocytes B). Il est aussi possible de mesurer la luminescence directement sur le sang total stimulé afin d'éviter les artefacts induits par la séparation cellulaire (**Favier et al., 1997**).

Les molécules biologiques attaquées par les oxydants, peuvent être soit oxydées sur des sites spécifiques, soit clivées ou au contraire polymérisées par l'effet direct des radicaux oxygénés. Ces biomolécules peuvent aussi subir des altérations suite à des attaques chimiques de composés natifs de l'oxydation des lipides (peroxydes ou aldéhydes) créant des composés d'addition. Ces lésions de composés biologiques sont utilisables pour évaluer un stress oxydant. (**Slater 1984**).

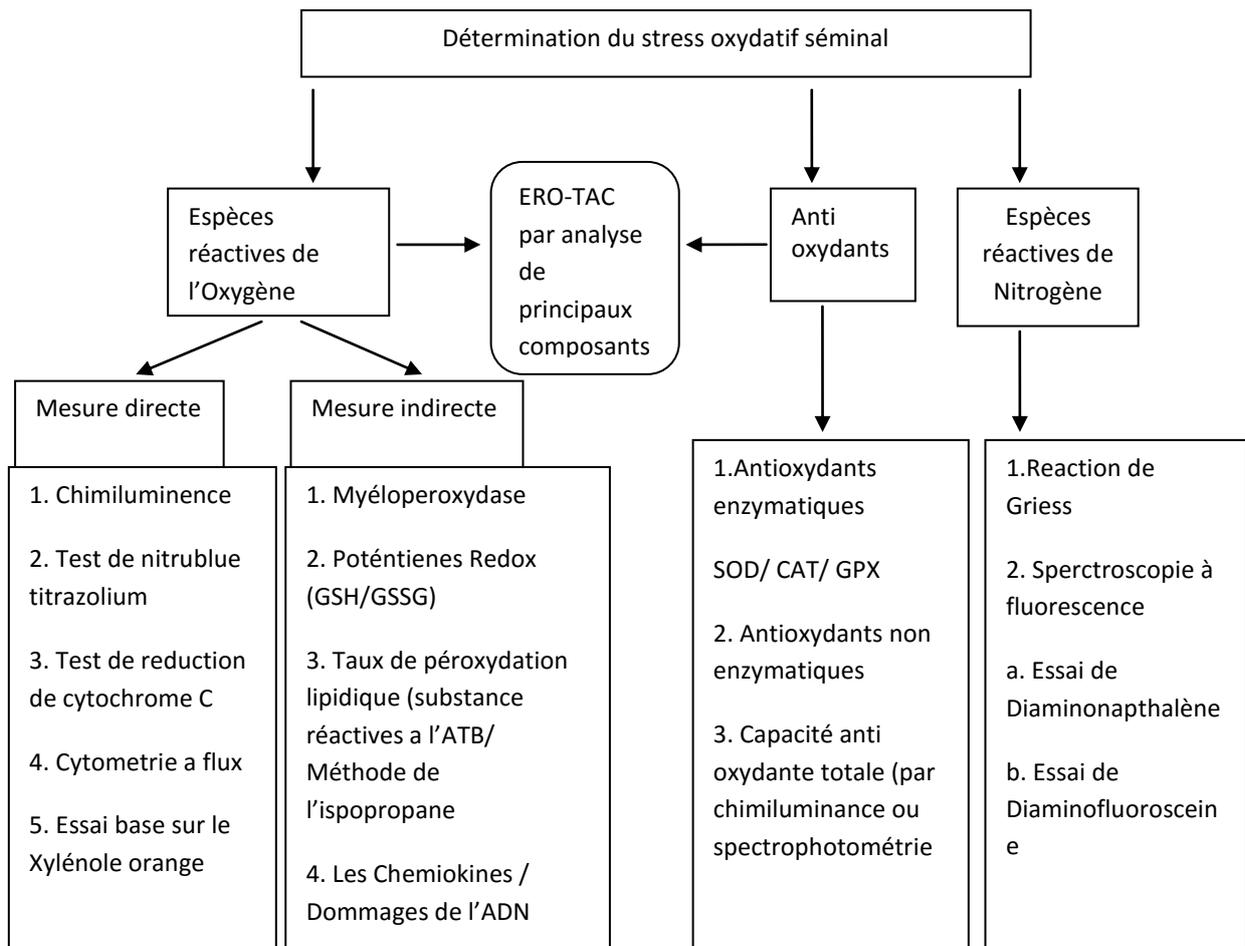
Les marqueurs les plus utilisés sont les composés résultant de la peroxydation lipidique, et plus particulièrement des lipides polyinsaturés des membranes et des lipoprotéines. La mesure des aldéhydes peut être réalisée globalement par réaction avec l'acide thiobarbiturique sous le nom de dosage des TRABs (Thiobarbituric acid reactant substances) qui se termine par une mesure de la coloration du conjugué. Le dosage le plus populaire, est celui du malonalaldéhyde (MDA) dont la mesure se fait par photométrie, fluorimétrie, ou chromatographie HPLC (**Richard et al., 1992 ; Favier 1997**).

Plusieurs lésions causées par les radicaux libres peuvent toucher le matériel génétique ; bases modifiées, cassures simples et doubles de la chaîne oligonucléotidique et pontages avec des résidus protéiques. Ces lésions sont partiellement impliquées dans de nombreux processus délétères (mutagenèse et carcinogenèse) et dans le vieillissement cellulaire. La recherche de produits d'oxydation radicalaire de l'ADN peut être réalisée dans des cellules isolées, des biopsies ou des liquides biologiques où se trouvent les composés oxydés (nucléosides ou bases après leur excision par les enzymes de réparation **(Favier 1997)**).

Les dérivés de réactions radicaux-ADN sont variables citons ; glycol de thymine, 8-hydroxyguanine, 8-hydroxyadénine, formamido-pyrimidine, cytosine-glycol, qui sont mesurables par CG-MS en fragmentométrie de masse ou par HPLC avec détection électrochimique mais les méthodes de leurs mesures sont lourdes ce qui limite leur intérêt en clinique. **(Demple et Levin, 1991 ; Cadet et al., 1992)**.

Des chercheurs britanniques ont développé l'essai "COMET" qui permet de mesurer les cassures dans l'ADN de simples cellules comme les lymphocytes et les spermatozoïdes. L'intensité relative de la fluorescence mesurée dans la queue de la comète est directement proportionnelle à la fréquence de cassures dans l'ADN. Ce procédé d'analyse très rapide peut être appliqué sans difficulté pour des études en routine. Avec cette méthode, des dégâts oxydatifs au niveau de l'ADN ont pu être observés. Un kit ELISA a été développé, ce qui a permis de rendre le dosage en routine de l'ADN oxydé encore plus facile **(Pincemail et al., 1999)**.

Dans le cas d'un stress oxydatif, chaque antioxydant est affecté à des degrés divers. Il est intéressant de disposer des méthodes permettant d'évaluer de manière plus globale la capacité antioxydante globale (CAG) d'un échantillon biologique **(Pincemail et al., 1999)**. L'appréciation des capacités antioxydantes de l'organisme est une méthode couramment utilisée, car des situations de stress oxydant provoquent une diminution des enzymes antioxydantes, des vitamines E et C ou du beta-carotène dans le plasma. Plusieurs auteurs recommandent la mesure des capacités antioxydantes totales du plasma ou des érythrocytes **(Favier 1997)**.



**Figure 5.** Diagramme montrant les différentes méthodes de mesure du stress oxydatif séminal.

### II.7. Polymorphismes des gènes antioxydants et infertilité masculine

Le génome humain contient plus de 11 millions de polymorphisme de simple nucléotide ou SNP et plus de la moitié d'entre eux sont répertoriés dans les banques de données. Ces variantes pourraient être impliqués dans la survenue de pathologies, mais il est encore difficile de préciser leur fonction simplement sur la base de la séquence nucléotidique, d'autant plus si le variant n'entraîne pas de modification d'acide aminé ou ne perturbe pas la structure ni la fonction de la protéine. On distingue des SNP qui ne changent pas la séquence de l'acide aminé (SNP synonymes) et des SNP non synonymes (nsSNP) qui entraînent une modification de l'acide aminé et donc un polymorphisme protéique. Il existe également des SNP régulateurs (*rSNP*) qui peuvent affecter l'expression, la spécificité tissulaire, voire la fonction de la protéine concernée. Ces deux derniers types de SNP (nsSNP et *rSNP*) sont relativement rares comparés au nombre total de SNP dans le génome humain (Ravel *et al.*, 2007).

L'étude de la génétique de l'infertilité masculine est bouleversée par l'analyse des polymorphismes. Ainsi, certains polymorphismes ou variantes des gènes impliqués dans le bon déroulement de la spermatogenèse sont considérés comme des facteurs de risques potentiels pouvant contribuer à la perte de la fertilité et plusieurs polymorphismes ont été ainsi trouvés d'être associés à la survenue d'une infertilité masculine (**Ravel *et al.*, 2007**).

Les enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase, le glutathion peroxydase, et la catalase, sont largement abondantes dans le plasma du sperme ou dans les spermatozoïdes (**Aitken *et al.*, 1996 ; Meseguer *et al.*, 2007**).

Chez les humains, la plupart des gènes codants ces enzymes contiennent des variations dans leurs séquences ce qui peut causer l'infertilité masculine de différentes façons. Comme les variations génétiques sont un facteur étiologique important dans l'infertilité masculine, Ceux-ci peuvent contribuer de manière significative à l'incidence de ce problème de santé en particulier sous un stress oxydatif important. Jusqu'à présent, des polymorphismes fonctionnels des gènes antioxydants NRF2, SOD, GST, NOS, CAT et GPX ont été signalés comme étant associés à l'infertilité masculine chez l'être humain (**Carrell et Aston 2011**).

Un certain nombre de gènes antioxydants impliqués dans la spermatogenèse ont été identifiés chez les mammifères, y compris NRF2, SOD, CAT, GPX, peroxydase (PRX), glutaredoxine (GRX), Thiorédoxine (TRX) et. Les enzymes encodées par ces gènes sont largement impliqués dans la réponse antioxydante cellulaire. NOS (**Kensler *et al.*, 2007 ; Nakamura *et al.*, 2010 ; Nguyen *et al.*, 2003 ; Williams et Ford 2004**).

On sait que l'activité séminale du SOD est positivement associé à la concentration de sperme et à la motilité, alors qu'elle est inversement associée à la fragmentation de l'ADN du sperme (**Aitken *et al.*, 1996 ; Yan *et al.*, 2014**). Les variations génétiques du SOD peuvent aussi être liées aux résultats de la procréation médicalement assistée. Une étude a montré que le polymorphisme Ala16Val dans le gène SOD2 est associé à l'infertilité et aux taux de grossesse dans les cycles de FIV (**Ruiz sanz *et al.*, 2011**). Dans une autre étude cas-témoins, la présence de l'allèle Ala-MnSOD (rs4880) était associée Avec une augmentation significative du risque de stérilité chez les sujets infertiles (**Faure *et al.*, 2014**). Des hommes infertiles avec des variantes CC SOD2 rs4880 ont montré un faible niveau d'activité de SOD (**Yan *et al.*, 2014**). Chez la population chinoise, la variante SOD2 Val16Ala (rs4880) est associée avec un risque significativement plus élevé

d'infertilité masculine, à des niveaux plus élevés de fragmentation de l'ADN du sperme et un faible niveau d'activité du SOD (**Yan et al., 2014 ; Ji et al., 2012**).

Lorsque plusieurs variations des gènes antioxydants ont été analysées, le PON1 Arg192Glu (rs662) et SOD2 Val16Ala (rs4880) ont été associés à un risque significativement plus élevé d'infertilité masculine et de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (**Ji et al., 2012**).

Dans des modèles de rats, il a été démontré que les SOD peuvent jouer un rôle important dans le développement des testicules et dans la spermatogenèse. Les transcrits d'ARNm de SOD ont été identifiés dans des testicules de rat et leur niveau le plus élevé a été détecté dans les tubules juste avant la spermiation (**Jow et al., 1993**).

Dans un modèle de Drosophile, des mutants masculins dépourvus de CuZn-SOD (SOD1) sont stériles, et le transgène d'un CuZn-SOD bovin peut résister à son phénotype stérile (**Reveillaud et al., 1994**). En outre, une altération accélérée des cellules durant la spermatogénèse a été observé chez les souris SOD1-knock-out sous contrainte thermique. Par conséquent, des perturbations génétiques ou des polymorphismes fonctionnels dans les SOD1 et SOD2 peuvent conduire à une spermatogenèse défectueuse (**Ishi et al., 2005**).

Il existe trois isoformes de GPX, à savoir cytosolique, mitochondrial et nucléaire (**Pushpa et al., 1995**). Dans un modèle de souris, Le GPX4 cytosolique était essentiel pour le développement embryonnaire et pour la spermatogenèse (**Pfeifer et al., 2001**), et la suppression du GPX4 mitochondriale (mGPX4) a également causé l'infertilité masculine, ce qui a altéré la qualité du sperme et à causer des anomalies structurelles sévères (**Schneider et al., 2009 ; Imai et al., 2009**). Une autre étude a suggéré que L'expression de phospholipides hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx), une sélénoprotéine appartenant à La famille des glutathion peroxydases, peut être associée à l'oligoasthenozoospermie. Cependant, aucun polymorphisme GPX n'a été associée à la stérilité masculine (**Diaconu et al., 2006**).

L'activité enzymatique catalase (CAT) a été démontrée d'être associée à une faible qualité du sperme (**Sabouhi et al., 2015 ; Kawakami et al., 2007**). Une étude a révélé que le génotype CAT-262T/T était négativement associé à l'infertilité chez les hommes infertiles idiopathiques (**Sabouhi et al., 2015**).

*Partie 2*  
*Travail pratique*

*Chapitre I*  
*Matériel et méthodes*

### I.1. Présentation de l'étude et objectifs

Une des principales hypothèses actuelles concernant l'étiologie de l'infertilité masculine idiopathique est une atteinte liée au stress oxydatif, des études récentes montrent qu'environ 30 à 40% des homes infertiles présentent des niveaux élevés d'ERO dans leurs plasma séminal, et des niveaux remarquablement bas d'enzymes et de substances antioxydantes par rapport aux hommes fertiles (**Methorst *et al.*, 2014**).

En raison de la forte potentialité d'interaction d'ERO avec le matériel génétique, les polymorphismes dans les gènes codant les enzymes antioxydantes peuvent jouer un rôle important pour les différences interindividuelles assurant l'équilibre oxydatif et le maintien de l'intégrité du génome humain. Les polymorphismes génétiques aux niveaux des gènes antioxydants ont été impliqués dans la tendance au cancer, à la cataracte, à l'Alzheimer, aux maladies cardiovasculaires... etc. Plusieurs polymorphismes (citons à titres d'exemple ; 251A/G du gène *SOD1* (rs2070424), -21A/T dans le promoteur du gène *CAT* (7943316) et -198C/T du gène *GPXI* (rs1050450)) causent des changements au niveau des activités de ces enzymes, ce qui peut entraîner une protection réduite contre le stress oxydatif. Cependant, l'effet de pleins d'autres variations sur les activités enzymatiques et sur l'infertilité masculine n'est pas encore prouvé (**Cebrian *et al.*, 2006 ; Mak *et al.*, 2007 ; Tang *et al.*, 2010**).

Les variations génétiques dans les gènes codant les enzymes SOD et CAT peuvent entraîner une diminution ou des troubles d'expression ou de régulation de leur activité enzymatique, et par conséquence, altérer la chaîne de détoxification des ERO. Donc, les variations génétiques au niveau des enzymes qui protègent la cellule contre les oxydants peuvent moduler le risque de plusieurs maladies sensibles aux stress oxydatif (**Forsberg *et al.*, 2001**) y compris l'infertilité masculine (**Agarwal *et al.*, 2015**). Alors nous avons choisis ces deux SNPs pour investiguer dans notre travail ; CAT-262C/T (rs1001179), SOD3362G/A (rs 77 2536512).

Aucune étude de ce type n'ayant été réalisé en Algérie, donc, il nous a semblé important d'évaluer chez des hommes infertiles de la Région de Batna, le statut oxydatif séminal ( SOD, CAT, GPX, MDA) et étudier des polymorphismes de simples nucléotides aux niveaux des gènes codant la SOD et la CAT, pour : i / essayer de déterminer dans quelle mesure un déséquilibre du statut oxydatif peut contribuer dans l'occurrence de différentes anomalies spermatiques et dans la baisse du potentiel de fertilité masculine, ii / essayer de chercher s'il existe un effet de CAT-262C/T (rs 1001179), SOD3 362G/A (rs 772536512) sur les activités enzymatiques et sur l'infertilité masculine. Et cela dans le but de démontrer l'utilité de l'usage de ces marqueurs en clinique et

prouver leurs importance dans l'amélioration des outils de diagnostics et donc de traitement de ce problème de santé.

Dans ce contexte, les objectifs de notre travail ont été ;

- D'évaluer, dans le plasma séminal, un des principaux marqueurs de la peroxydation lipidique et du stress oxydatif, le MDA, avec trois enzymes antioxydantes ; SOD, CAT et GPX, afin de chercher des relations potentielles pouvant exister entre ces derniers et la baisse de la fertilité de l'homme, à travers les différents paramètres spermatiques (concentration, morphologie, mobilité, viabilité...) ainsi qu'avec la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.
- D'étudier deux polymorphismes génétiques de type SNP (CAT -262C/T, SOD3 362 G/A, pour déterminer une éventuelle association entre ces variations et les activités enzymatiques concernées ainsi qu'avec les différents cas d'infertilité masculine idiopathique inclus dans notre étude.

Pour mieux cerner le problème, il nous a paru nécessaire de fixer au préalable les objectifs secondaires suivants,

- L'étude de différentes étiologies liées à l'infertilité masculine et la détermination de la fréquence des perturbations spermiologiques rencontrées chez la population recrutée.
- L'évaluation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, qui peut servir d'un indice qui reflète le niveau des dommages oxydatifs et des atteintes spermatiques.
- Le screening génétique des micros délétions du chromosome Y chez les patients azoospermiques, oligospermiques et oligo-asthéo-tératozoospermiques pour éliminer l'implication de ce facteur causatif de l'infertilité.
- L'établissement d'un bilan hormonal pour éliminer les sujets présentant des pathologies endocrines.

## **I.2. Recrutement des cas et des témoins**

Il s'agit d'une étude épidémiologique transversale de type cas témoin, qui a ciblé la population de la région de Batna, le recrutement des malades et des témoins a été effectué au niveau du CHU de Batna (services d'urologie et d'histologie) et de laboratoires d'analyses privés ; Elfarabi et Gouaref, durant une période qui s'est étendue du mois de Mars 2013 au mois de Mai 2016.

### **I.2.1. Critères d'inclusion**

#### **a. Les cas (infertiles)**

Les hommes infertiles qui ont fait objet de notre étude ont été orientés par des médecins urologues ou gynécologues en vue d'investigation d'une infertilité ou bien d'une stérilité du couple, avec :

- Une incapacité de concevoir pour une période de 12 mois ou plus ;
- Un partenaire féminin considéré comme sain de toutes pathologies influençant leur fertilité ;
- Une infertilité idiopathique, sans cause définit.

#### **b. Les témoins (fertiles)**

Les témoins ont été orientés pour effectuer des bilans de control, des spermo-cultures ou tout simplement ont participé volontairement à l'étude. Leur recrutement a été basé sur :

- Une santé évaluée comme optimale d'après un interrogatoire, un spermogramme et un spermocytogramme normal;
- Une fertilité prouvée avec au moins un enfant déjà né sans avoir des difficultés de concevoir à nouveau.

### **I.2.2. Critères d'exclusion**

Afin d'éliminer l'implication de plusieurs paramètres sur le statut oxydatif et dans le but d'assurer une santé optimale des témoins participant dans notre étude, nous avons exclus de l'étude, les témoins :

- Sous prise de médicaments, de vitamine et/ou antioxydants durant l'étude ;
- Qui présentent des antécédents d'infertilité;
- Apparentés entre eux ou avec les cas ;
- Agés de plus de 55 ans ;

- Avec des maladies chroniques (Diabète, hypo ou hypertension) ;
- Avec des infections ;
- Cancer des testicules ou de prostate.

Afin d'éliminer les effets de plusieurs facteurs sur la fertilité des hommes et sur leur statut oxydatif, nous avons exclu de l'étude les cas ayant un/une combinaison des cas suivants :

- Une infertilité d'origine génétique (microdélétions du chromosome Y) ;
- Une infertilité d'origine obstructive;
- Une Cryptorchidie ;
- Une infection et une leucocytospermie ;
- Une varicocèle ;
- Une infertilité d'origine immunologique;
- Prise de traitement hormonal, d'antioxydants ou vitaminothérapie ;
- Maladies chroniques ou cancer ;
- Age de plus de 55 ans.

Les cas ou les témoins exposés aux rayons X aux températures élevées et aux pesticides ont été exclus de l'étude.

Après une première étape de sélection, basée sur l'interrogatoire et l'examen physique, nous avons choisi 256 hommes infertiles et 153 témoins fertiles, par la suite, une seconde étape de sélection basée sur les résultats de spermogramme et de spermocytogramme, des dosages hormonaux et du screening des microdélétions du chromosome Y a été adoptée. Les raisons de l'exclusion après la seconde étape de sélection sont présentées dans le tableau 5.

**Tableau 5.** Raisons d'exclusion des cas infertiles et des témoins fertiles pour notre étude

Nombre de patients	Raisons de l'exclusion
Les cas infertiles	
30	Refus de signer le consentement
20	Prélèvements biologiques insuffisants et/ou inadéquats
11	Bilans incomplets
12	Infection / Leucospermie
1	Microdélétions du chromosome Y
10	Raisons hormonales
4	Agrégation du sperme
Les témoins fertiles	
5	Refus de signer le consentement
6	Prélèvements biologiques insuffisants et/ou inadéquats
2	Infection / Leucospermie
9	Bilans incomplets

Compte tenu du contexte social de la région, du faible niveau de coopération des hommes, des critères d'inclusion et d'exclusion très rigoureux et de la difficulté d'effectuer tous les prélèvements nécessaires pour nos analyses à la fois, la taille de l'échantillon a été fixée arbitrairement au nombre maximal atteint. Donc, au final, nous avons recruté 299 sujets de sexe masculin dont 168 cas (hommes infertiles) et 131 témoins (hommes fertiles).

Les sujets infertiles et les témoins fertiles inclus ont tous signé un consentement éclairé (**Annexe 1**) en vue d'utilisation de leurs prélèvements pour nos analyses biologiques. Les informations personnelles et médicales de ces participants ont été gardées anonymes et protégées selon des précautions prises en fonction des principes cités dans la déclaration de Helsinki 1964 et de ses modifications ultérieures. Tous les sujets ont fournis volontairement :

- Un interrogatoire détaillé, (**Annexe2**).
- Un prélèvement de sang dans des tubes secs et sur différents anticoagulants ; héparine et EDTA.
- Deux prélèvements de sperme espacés de 2 mois.

### I.3. Recueil de sperme et examens spermologiques

Le sperme est recueilli au niveau des laboratoires, obligatoirement par masturbation. Dans des cas exceptionnels, il peut être collecté à domicile mais le patient doit le transporter rapidement pendant 1 heure après l'éjaculation sous une température de 20° à 37° C. Une abstinence sexuelle fixée à 3 jours est nécessaire avant le prélèvement. Tous les éjaculats doivent être recueillis et surtout la première fraction riche en spermatozoïdes. L'échantillon ensuite est maintenu dans une température ambiante pendant 30 min pour sa liquéfaction spontanée avant l'examen (**OMS 2010**).

#### I.3.1. Spermogramme

Le spermogramme est un examen qui permet d'évaluer plusieurs paramètres macroscopiques (volume, agglutinats et pH) et microscopiques (mobilité, vitalité, concentration et dénombrement des leucocytes) et de classer ces paramètres en normaux ou pathologiques selon la dernière édition de l'OMS (2010).

##### ➤ **Mesure du volume**

Le volume de l'éjaculat est déterminé en utilisant une pipette graduée, la mesure doit être faite à l'échelle de 0.1 mL. La valeur normale doit être égale ou supérieur à 1,5 ml (**OMS 2010**).

##### ➤ **Mesure du pH**

Le pH du sperme est évalué selon le protocole suivant : une goutte de sperme bien homogénéisé est déposée sur une bandelette de papier pH pendant 20 à 30 secondes (la couleur doit être uniforme), puis la couleur obtenue est comparée à la gamme étalon de pH. Le pH doit être mesuré toujours au même moment, dans l'heure qui suit l'éjaculation et doit être compris entre 7,2 et 8 (**OMS 1999**).

##### ➤ **Evaluation de la mobilité totale**

L'évaluation de la mobilité totale a été effectuée selon le protocole suivant décrit par l'**OMS 2010**: une goutte de sperme de 10 µl est déposée sur une lame propre, puis recouverte à l'aide d'une lamelle de 22 mm x 22 mm ce qui permet d'obtenir une préparation de 20 µm d'épaisseur ; étape très important qui permet un mouvement libre des spermatozoïdes et permet aussi d'avoir une image nette de la préparation car le poids de la lamelle étale l'échantillon tout en permettant une observation optimale au grossissement x40. On laisse les préparations se stabiliser puis on examine la mobilité de 100 spermatozoïdes sur 5 à 10 champs de la première préparation. L'évaluation doit être répéter sur une seconde préparation et on calcule la moyenne des deux.

Selon les critères fixés par l’OMS (2010) ; dans chaque champ observé, la mobilité de chaque cellule spermatique est évaluée « a », « b », « c » ou « d » en fonction des critères suivants :

- « a » rapide et progressif : trajectoires rectilignes, mouvement dit fléchant,  $<25\mu\text{m/S}$  à  $37^\circ\text{C}$  ou  $>20\mu\text{m/S}$  à  $20^\circ\text{C}$  ( $25\mu\text{m}$  correspond à peu près à cinq longueurs de tête ou à la moitié de la longueur du flagelle).
- « b » lent ou faiblement progressif : trajectoires rectilignes mais faible vitesse.
- « c » mobile et non progressif : déplacement de moins de deux longueurs de la tête en une seconde ou aucun déplacement avec oscillations de la tête sur place et/ ou simple mouvements flagellaires.
- « d » immobile : aucun déplacement, tête et flagelle immobiles.

Le pourcentage total des spermatozoïdes mobiles (a+b+c) doit dépasser les 40% et le pourcentage des spermatozoïdes mobiles progressifs (a+b) doit être supérieur à 32%. En dessous de ces valeurs, on parle d’une asthenozoospermie (**OMS 2010**).

#### ➤ **Evaluation de la vitalité par le test à l’Eosine-Nigrosine**

La vitalité des spermatozoïdes est estimée par l'évaluation de l'intégrité de la membrane plasmique des cellules. La méthode utilisée est basée sur l'exclusion d'un colorant vital par les spermatozoïdes vivants, cependant le colorant pénètre dans les spermatozoïdes morts à membrane altérés et ne ressort pas.

Cinquante  $\mu\text{l}$  de sperme sont prélevés et mélangés avec le même volume d'une suspension d'Eosine-Nigrosine dans un micro tube, on agite soigneusement. Après 30 secondes, on réalise des frottis à partir de cette préparation et on les examine sous microscope à un grossissement  $\times 100$  à immersion. 200 spermatozoïdes sur deux préparations différentes sont évalués pour bien déterminer le pourcentage des spermatozoïdes vivants.

Le pourcentage total de spermatozoïdes vivants doit dépasser les 58%. En dessous de cette valeur on parle d’une necrozoospermie (**OMS 2010**).

➤ **Mesure de la concentration des spermatozoïdes**

La mesure de la concentration est réalisée par un hémocytomètre (le comptage se fait par l'utilisation de la cellule de Malassez).

Cinquante  $\mu\text{L}$  de sperme sont Dilués, au minimum de  $1/20^{\text{ème}}$ . On introduit  $10 \mu\text{l}$  de sperme dilué par capillarité dans chacune des chambres de la cellule. Au moins 200 spermatozoïdes dans chacune des 2 chambres de la cellule sont évalués et seules les spermatozoïdes complets sont comptés (tête + flagelle).

La concentration des spermatozoïdes doit être supérieure ou égale à 15 millions /mL si non on parle d'une oligospermie (**OMS 2010**).

➤ **Mesure de la concentration des cellules rondes et des leucocytes**

La concentration des cellules spermatiques est estimée selon le même principe de comptage de spermatozoïdes. En comptant les spermatozoïdes, on fait le comptage (en même temps) des autres types cellulaires ayant sédimentées dans la chambre de la cellule de Malassez pour déterminer leur concentration en million/mL. Ceux-ci comprennent les cellules épithéliales de l'appareil génito-urinaire, ainsi que les leucocytes et les cellules germinales immatures.

### **I.3.2. Spermocytogramme**

Le spermocytogramme, appellation usuelle pour l'analyse morphologique des spermatozoïdes humains comprenant l'évaluation du pourcentage des spermatozoïdes morphologiquement normaux et la détermination de l'incidence des diverses anomalies morphologiques.

La coloration utilisée est celle de Papanicolaou, cette technique donne une bonne coloration des spermatozoïdes et d'autres cellules. Elle colore les régions acrosomiques et post-acrosomiques de la tête, l'excès de cytoplasme résiduel, la pièce intermédiaire et la pièce principale. Le protocole utilisé pour réaliser le spermocytogramme est comme suit :

Une goutte de sperme est étalée sur une lame, puis laissée sécher. Le frottis est placé dans l'alcool à 80%, à 70%, à 50% puis rincé à l'eau distillée. Après séchage, la préparation est incubée dans l'Hematoxyline pendant 3 min puis rincée par l'eau courante. Par la suite, une série d'incubations dans différentes solutions est réalisée : dans la solution de Scott pendant 4 min, dans l'alcool à 50% , 70%, 80% et 90% et en fin, dans l'EA-50d pendant 5 min. Dans une autre étape,

la lame est immergée 5 fois dans l'alcool à 95 %, puis alcool 99.5% pendant 2 min. Après ça, le frottis est immergé 3 fois dans le Xylol environ 2 min, plongé dans une solution de type histosol pour quelques secondes, puis laissé sécher à l'air libre pendant 12h à plat

L'observation microscopique se fait à un objectif x 100 à immersion, 200 spermatozoïdes sont comptés et classifiés sur deux préparations différentes pour calculer la moyenne des formes typiques et atypiques dans le frottis.

#### **I.4. Dosages Hormonaux**

Les dosages hormonaux ont été effectués au niveau du laboratoire de biotechnologie des molécules bioactives et de la physiopathologie cellulaire et au niveau des laboratoires médicaux privés (Gouaref et Elfarabi) à Batna.

FSH, LH, testostérone et prolactine ont été dosées à l'aide d'un automate ; le Mini Vidas Biomérieux utilisant des kits spécifiques pour chaque hormone, dont le principe se base sur l'association de la méthode immuno-enzymatique sandwich à une détection finale en fluorescence (ELFA).

Le plasma sanguin est prélevé puis transféré dans les puits contenant l'anticorps anti-hormone (FSH, LH, Prolactine, Testostérone) marqué à la phosphatase alcaline (conjugué). Le mélange échantillon/conjugué est aspiré puis refoiler plusieurs fois par le cône afin d'augmenter la vitesse de réaction. Cette opération permet à l'antigène de se lier au conjugué formant ainsi un sandwich. Des étapes de lavage sont effectuées pour éliminer les composés non fixés.

Lors de l'étape finale de révélation, le substrat (4-Méthyl-ombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoilé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-Méthyl-ombelliférol) dont la fluorescence émise est mesurée à 450 nm. La valeur du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration de l'antigène présent dans l'échantillon. A la fin du test, les résultats sont calculés automatiquement par l'instrument par rapport à une courbe de calibration mémorisée, puis imprimer. Pour chaque hormone, le dosage a été répété deux fois.

## I.5. Etude du statut oxydatif du plasma séminal

### 1.5.1. Mesure de l'activité du Superoxyde dismutase

Le rôle du superoxyde dismutase (SOD) est d'assurer la dismutation du radical superoxyde toxique ( $O_2 \bullet$ ), produit au cours du stress oxydatif, en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. L'activité du SOD (E.C. 1.15.1.1.) dans le plasma séminal est mesurée par un dosage colorimétrique. Nous avons utilisé la méthode colorimétrique disponible (RANSOD, Randox Laboratories Ltd, UK ; **Annexe 3**) (**Zelen *et al.*, 2010**).

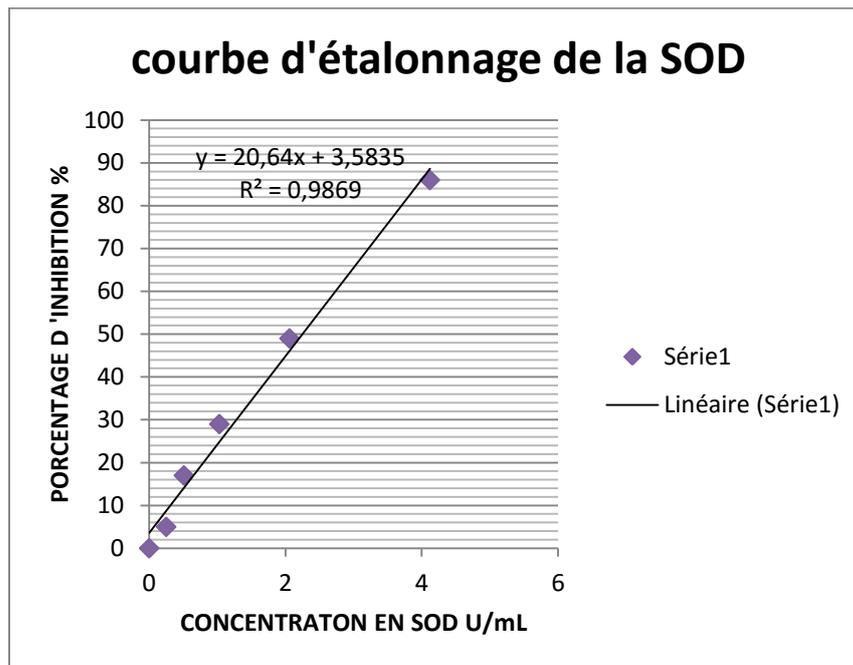
#### ➤ PRINCIPE

Cette méthode utilise la xanthine et la xanthine oxydase pour générer des radicaux superoxydes qui réagissent avec l'acide 2- (4-iodophényl) -3- (4-nitrophényl) -5-phényl tétrazolium (I.N.T) pour former un colorant formazan rouge. L'activité du SOD est alors mesurée par le degré d'inhibition de cette réaction. Une unité du SOD est celle qui provoque une inhibition de 50% du taux de réduction d'INT sous les conditions de l'essai.

#### ➤ PROCÉDURE

Le plasma séminal est décongelé, une dilution de 1/30 est préparée avec un tampon phosphate (0.01 mol/L, pH 7,0). On ajoute 50  $\mu$ L des échantillons dilués et des standards dans des tubes à essais en verre. Après, 1.7 mL du substrat mixte sont ajoutés à chaque échantillon et standard (S2-S6), on vortex le tout et on ajoute de 250  $\mu$ L de la xanthine oxydase à chaque échantillon et standard (S2-S6). Le spectrophotomètre doit être Réglé à une longueur d'onde de 505 nm pour effectuer une lecture de l'absorbance initiale (A1), puis de l'absorbance finale (A2) après 3 minutes. Le dosage était réalisé à 37 ° C.

Le blanc a été préparé en mélangeant 0.05 ml de diluant, 1.7 mL de substrat mixte et 250 $\mu$ L de la xanthine oxydase). Le tampon phosphate a été utilisé comme standard numéro1. L'activité du SOD a été mesurée en utilisant la courbe d'étalonnage du pourcentage d'inhibition pour chaque étalon par rapport au log10 et l'activité de la SOD a été exprimée en U / mL.



**Figure 06.** Courbe d'étalonnage de la superoxyde dismutase.

### I.5.2. Mesure de l'activité du glutathion peroxydase

Le glutathion peroxydase est une enzyme antioxydante qui joue un rôle central dans la détoxification des peroxydes en utilisant la forme réduite de glutathion (GSH) comme donneur d'électrons (Fujii *et al.*, 2005). Pour effectuer le dosage du GPX, nous avons utilisé la méthode colorimétrique disponible sur le marché (RANSEL, Randox, Laboratories Ltd, UK) (Annexe 4).

#### ➤ PRINCIPE

Le glutathion peroxydase (GPX) catalyse l'oxydation du glutathion (GSH) en hydroperoxyde de cumène en présence de glutathion réductase (GR) et NADPH. En présence de glutathion-réductase, le glutathion oxydé est immédiatement converti en forme réduite avec une oxydation simultanée de NADPH en NADP<sup>+</sup>. La diminution de l'absorbance à 340 nm est mesurée (Paglia et Valentine 1967). Le principe de la réaction est le suivant:



#### ➤ PROCEDURE

Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé la méthode Semi-micro, décrite dans le protocole fournit avec le kit selon les étapes suivantes :

On prend 0.05mL plasma séminal décongelé et on effectue une dilution avec 2 mL de l'agent diluant. On place 20µL des échantillons dilué dans des tubes à essais en verre, on ajoute 1 mL du réactif R1, puis 40 µL du réactif R2 (Cumenehydroperxyde) à chaque échantillon et on vortexe le tout. Le spectrophotomètre doit être réglé à une longueur d'onde de 340 nm. On mesure l'absorbance initiale (A1), et après 3 minutes on refait la lecture de l'absorbance finale (A2). Le dosage a été réalisé à 37 ° C. Le blanc est préparé en mélangeant 0.02 mL de diluant, 1 mL du réactif R1 et 40 µL de Cumène.

La concentration de glutathion peroxydase peut être calculée à partir de la formule suivante:  
**[GPX] uA = 8412 X ΔA 340nm /minute.**

### I.5.3. Mesure de l'activité de la catalase

La catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) est une enzyme antioxydante qui joue un rôle central dans la défense primaire contre le stress oxydatif, elle catalyse la décomposition De l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O (Kodydkova *et al.*, 2014; Saadat *et al.*, 2014). L'activité séminale de la catalase a été mesurée suivant la méthode colorimétrique décrite par Aebi (1984) et Hadwana et Hussein. (2016).

#### ➤ PRINCIPE

Cette méthode utilise un facteur de correction (teste de contrôle) pour exclure l'interférence qui résulte de la présence d'acides aminés et des protéines dans l'échantillon contenant la catalase. L'absorbance du test de contrôle concerne alors uniquement des composés d'interférence trouvés dans le sérum. En soustrayant l'absorbance du test de contrôle à partir de l'absorbance des essais, nous éliminons l'interférence de tout composé apte de réagir avec le molybdate d'ammonium tel que les acides aminés ou protéines. Cela signifie que l'absorbance est liée uniquement aux produits qui n'ont pas réagi au peroxyde d'hydrogène, ce qui reflète avec précision l'activité de la catalase (Hadwana et Hussein 2016).

#### ➤ PROCEDURE

Le tableau 06, explique le protocole détaillé du dosage de la catalase. Pour déterminer l'activité de la catalase, l'équation suivante est utilisée

$$2.303/t \times [\log S^{\circ}/S-M] \times Vt/Vs \quad U/ ml \quad \text{où}$$

T: temps

S<sup>°</sup>: absorbance du standard

S : absorbance de l'échantillon

M : absorbance du control (facteur de correction)

Vt : volume totale de la réaction

Vs : volume du plasma séminal utilisé

**Tableau 06.** Procédure de dosage de la catalase.

Réactifs	Test	Contrôle	Standard	Blanc
Plasma séminal	100µL	100µL	–	–
Eau distillée	–	1000µL	100µL	1100µL
Peroxyde d'hydrogène (20mM)	1000µL	–	1000µL	–
Mélanger au vortex Incubation 3min				
Molybdate (32.4 mmol/L)	1mL	1mL	1mL	–
Lecture spectrophotométrique a 374 nm à 37°C				

#### I.5.4. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Les peroxydes lipidiques se désintègrent rapidement et forment des composés réactifs du carbone. Parmi ceux-ci, le malondialdéhyde (MDA) qui est l'un des sous-produits de la peroxydation lipidique (LPO). Le MDA est un marqueur important pour le stress oxydatif, il est largement étudié pour surveiller le degré des dommages causés par la LPO, plusieurs auteurs le considèrent comme un outil de diagnostic et d'analyse de l'étiologie de l'infertilité masculine (*Aitken et al., 1987; Laudat et al., 2002*).

##### ➤ PRINCIPE

La peroxydation des lipides a été mesurée en se basant sur la réaction de MDA avec de l'acide thiobarbiturique (ATB) formant un complexe MDA-TBA fortement absorbé a 532 nm selon la méthode décrite par *Rao et al. (1989)*.

### ➤ PROCEDURE

0.76 g de l'acide thiobarbiturique (TBA) est mélangé avec 100 mL d'eau distillée, on ajoute 0.5g de l'hydroxyde de sodium (NaOH) et 100 mL de l'acide acétique glacial, on mélange le tout. 0.5 mL du mélange précédent et 0.9 mL d'eau distillée sont ajoutés à 0.1 mL du plasma séminal. Le mélange est placé dans un bain marie et laissé bouillir pour 45 min. On Refroidit le tout dans un bac à glace puis on Centrifuge durant 10 min à 4000 t/min. L'absorbance du surnageant est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à 534 nm.

La concentration du complexe est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{MDA-TBA} = \text{Ab} \times 10^6 \times 10^3 \times \text{Vs} / (1.56 \times 10^5) \times \text{Vt}$$

Ab : absorbance de l'échantillon ;

Vs : volume de l'échantillon ;

Vt : volume total

$1.56 \times 10^5$  : coefficient de l'absorption molaire du complexe MDA-TBA .

### I.6. Evaluation de la fragmentation de L'ADN spermatique

L'évaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique a été effectuée à l'aide d'un kit (Halosperm kit, HalotechDna S.L, Spain) (**Annexe 5**). La méthode exploitée par ce kit est basée sur le test de la dispersion de la chromatine spermatique (SCD) (**Fernandez *et al.*, 2003**). Ce kit donne une possibilité d'étudier les cellules spermatiques intactes non fixées sur un échantillon frais, congelé ou dilué ce qui a été idéal pour l'état de nos échantillons.

### ➤ PROCEDURE

On effectue une dilution du sperme dans le PBS pour obtenir une concentration spermatique de 5-10 millions/mL. L'agarose est fluidifié par le placement des tubes Eppendorf dans un micro-onde pour 5 secondes, après la dissolution totale, le tube est maintenu dans un bain marie à 37°C.

25L de l'échantillon dilué sont ajoutés au tube contenant l'agarose et on mélange le tout. On place 15 µL de la suspension sur la partie traitée de la lame et recouvrement avec une lamelle (la préparation est gardée en position horizontale pour cette étape et toutes les autres qui suivent). La lame est mise dans le réfrigérateur jusqu'à la solidification totale de l'agarose, après La lame est ressortie du réfrigérateur et est retirée avec précaution tout en gardant la lame en position horizontale. La préparation est ensuite immergée dans la solution dénaturante acide pendant 7 min, incubée dans la solution de lyse pendant 25 min, et lavée ensuite à l'eau distillé pour éliminer

toutes traces des deux solutions précédentes. La lame est incubé dans de l'éthanol à 70% pendant 2 min, à 90% pendant 2 autres min et en fin à 100% pour 2 min, puis laissée Séchée à l'aire libre. Une coloration des lames est effectuée à l'aide du colorant Diff-quick pour la visualisation microscopique à un grossissement X40.

On compte 200 spermatozoïdes et on doit les classifier en fonction de la présence/ absence et la largeur de l'halo qui les entoure comme l'explique bien l'annexe numéro 5.

## **I.7. Etude moléculaire**

### **I.7.1. Extraction d'ADN à partir du sang total**

L'extraction de l'ADN à été effectuée au niveau du centre de recherche en Biotechnologie à Constantine (CRBT) en utilisant le "PureLink Genomic DNA Mini Kit" Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA) (**Annexe 6**), c'est un kit qui permet une purification rapide et efficace de l'ADN génomique. Le principe de ce kit est basé sur la liaison sélective de l'ADN génomique à une membrane à base de silice en présence de sels chaotropiques. L'ADN isolé est d'une longueur de 20-50 kb et une quantité qui varie entre 3 à 10 µg pour chaque 200 µl de sang total.

#### **a. Préparation du lysat**

200µL de sang sont placés dans un micro tube stérile, on ajoute 200 µL de Protéinase K et 200 µL de RNase. On vortexe le tout puis on incube pendant 2 min a température ambiante. 200 µL de tampon de lyse/liaison sont ajoutés aux tubes précédents suivis d'une homogénéisation vigoureuse. On Incube le tube dans un bain marie à 55°C pendant 10 min, afin de promouvoir la dégradation protéique et en fin, on ajoute de l'éthanol à 100% au lysat et on vortex le tout jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.

#### **b. Liaison de l'ADN / membrane de silice**

Le lysat préparé préalablement est transféré à une colonne spin placée dans un tube de collection, on centrifuge à 10.000 g pendant 1 min puis on éliminer le tube de collection et on le remplace par un nouveau tube fourni avec le kit.

**c. Lavage de l'ADN**

500µL de tampon de lavage 1 sont ajoutés à la colonne de silice, le tout est centrifugé à 10.000 g pendant 1 min, puis le tube de collection est éliminé et remplacé par un nouveau fourni avec le kit. On ajoute 500 µL du tampon de lavage 2 à la colonne de silice et on centrifuge à une vitesse maximale pendant 3 min. En fin, on élimine le tube de collection.

**d. Elution de l'ADN**

On ajoute un volume qui varie entre 25 et 200 µL (dans notre cas 100 µL) de tampon d'éluion génomique à la colonne spin, on place la colonne dans un micro tube stérile (1.5 mL), le tout est incubé pendant 1 min à température ambiante puis centrifugé à une vitesse maximale pendant 1 min (le tube contient l'ADN purifié).

Pour récupérer une quantité maximale d'ADN de la colonne, on a procédé à une deuxième éluion dans un autre micro tube avec un volume plus faible de tampon (50 µL) et avec une centrifugation pour plus d'une minute.

L'ADN isolé est quantifié et sa pureté est mesurée à l'aide d'un Nanodrop (les concentrations ont été comprises entre 40 et 65 ng/µL). L'ADN est ensuite aliquoté dans des micros tubes, une partie a été congelé à -20°C et une autre a été conservé à 4°C.

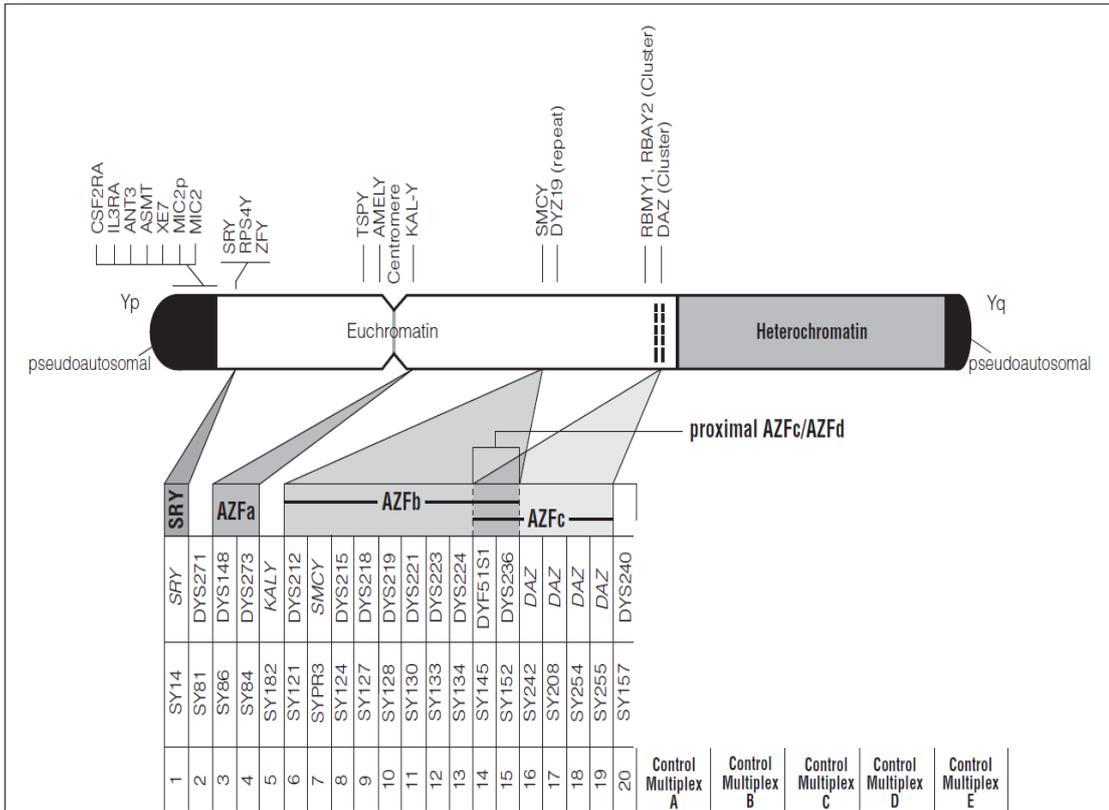
Pour notre étude, nous avons effectué une double extraction (2 x 200µl de chaque échantillon) pour obtenir une quantité maximale d'ADN et pour éviter toutes sortes d'imprévus vu que les analyses moléculaires ont été réalisées ailleurs et l'ADN a été transporté à plusieurs reprises pendant des heures sans congélation ce qui provoque des risques d'altérations.

**I.7.2. Screening des microdélétions du chromosome Y**

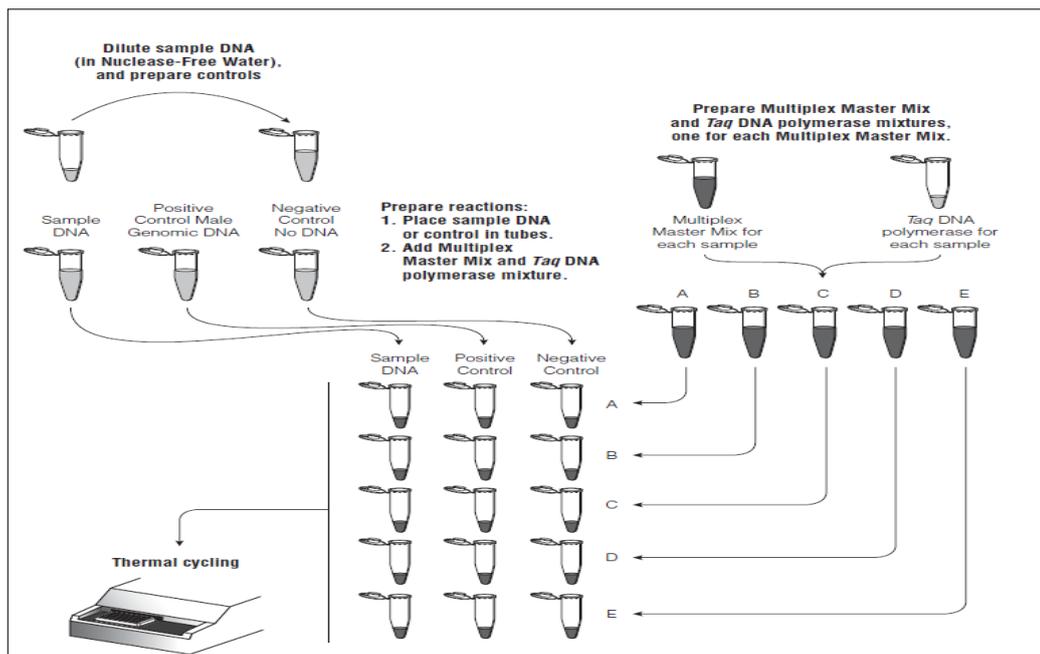
L'étude des microdélétions du chromosome Y a été effectuée au niveau du laboratoire de génétique, département des sciences biologiques, faculté des sciences, université Elyarmouk, Irbid, Jordanie. En utilisant le Y Chromosome AZF Analysis System (Promega, Madison, WI USA) (**Annexe 7**), qui fournit une méthode de détection de la région AZF du chromosome Y humain.

Le système consiste en 20 paires d'amorces qui sont homologues à des sites STS (sequence-tagged sites) (figure 07), précédemment identifiés et cartographiés. Ces amorces amplifient de courts segments d'ADN non polymorphes du chromosome Y, lorsqu'ils sont utilisés dans des réactions de polymérisation en chaîne. Les amorces utilisées par le kit ont été combinées en cinq

jeux de Multiplex Master Mix en vue de leur utilisation dans la PCR multiplexe. Ceci permet de déterminer la présence ou l'absence des 20 STS en effectuant simultanément cinq amplifications de PCR selon le protocole décrit dans la figure 8.



**Figure 07.** Schématisation des principaux STSs analysés des régions AZF a,b et c par le kit AZF Analysis System (AZF Analysis System technical manual, Promega, Madison, USA).



**Figure 8.** Représentation schématique du protocole d'analyse des microdélétions du chromosome Y (AZF Analysis System technical manual, Promega, Madison, USA).

La figure 8 montre le protocole d'installation de la PCR multiplexe. Dans cette Procédure, les échantillons d'ADN sont placés dans des tubes de réaction. Séparément, La taq ADN polymérase est ajoutée à chacun des mélanges contenant le multiplex master mix. Puis ce dernier est ajouté au tube de la réaction contenant l'échantillon d'ADN. Chaque échantillon d'ADN est analysé à l'aide des cinq mélanges multiplexes (A, B, C, D et E).

Des réactions d'amplification utilisant le contrôle positif de L'ADN Génomique, fournit avec le kit, ont été toujours exécutées en parallèle avec les échantillons. Son amplification devrait toujours produire les produits d'amplification attendus.

Une réaction d'amplification d'un contrôle négatif devrait également être exécutée parallèlement aux échantillons pour vérifier que les réactifs ne sont pas contaminés par l'ADN. L'amplification par PCR d'un contrôle sans ADN ne devrait donner lieu à aucun produit d'amplification.

**Tableau 07.** Composition du mix PCR pour le screening des microdélétions du chromosome Y.

Mix	Volume /tube de PCR (25% µl)
Multiplexe master mix/ Gotaq ADN polymérase	20 µL
ADN génomique double brin	5 µL

**Tableau 08.** Conditions de la PCR multiplexe.

Etape	Temps	Température °c	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	5 min	93	1
Dénaturation	60 s	93	40
Hybridation	30 s	56	40
Elongation	30 s	72	40
Elongation finale	5 min	72	1

Les produits obtenus de chaque multiplexe mix ont subi une migration par électrophorèse sur gel d'agarose (4%) immergé dans un tampon TBE (1X) ; (10.9 g/L Tris-HCl, 5.56g/L acide Boric, 0.93g/L EDTA.Na<sub>2</sub>, complétant le volume a 1 litre avec de l'eau distillée ; pH 8.0) qui

contient 0.5µg/ml de Bromure d’Ethidium. La migration a été faite à 90V pendant 2h et le gèle a été finalement visualisé sous UV.

La longueur des fragments est estimée par rapport à un marqueur de taille de 50 pb et l’indentification des bandes est faite en présence de contrôles positifs (fournit avec le kit) et négatifs (free nucléases H<sub>2</sub>O). Les résultats ont été notés dans des tableaux précisant l’absence/présence de chaque STS pour tous les échantillons testés (figure 09).

Multiplex A Master Mix				Samples (+/-)					
STS	Locus	Product Size (bp)	Map Position						
SY254	DAZ	380	18						
SY157	DYS240	290	20						
SY81	DYS271	209	2						
SY130	DYS221	173	11						
SY182	KAL-Y	125	5						
	SMCX	83	Control						

Multiplex B Master Mix				Samples (+/-)					
STS	Locus	Product Size (bp)	Map Position						
SYPR3	SMCY	362	7						
SY127	DYS218	274	9						
SY242	DAZ	233	16						
SY208	DAZ	140	17						
	SMCX	83	Control						

Multiplex C Master Mix				Samples (+/-)					
STS	Locus	Product Size (bp)	Map Position						
SY128	DYS219	228	10						
SY121	DYS212	190	6						
SY145	DYF51S1	143	14						
SY255	DAZ	124	19						
	SMCX	83	Control						

Multiplex D Master Mix				Samples (+/-)					
STS	Locus	Product Size (bp)	Map Position						
SY133	DYS223	177	12						
SY152	DYS236	125	15						
SY124	DYS215	109	8						
	SMCX	83	Control						

Multiplex E Master Mix				Samples (+/-)					
STS	Locus	Product Size (bp)	Map Position						
	ZFX/ZFY	496	Control						
SY14	SRY	400	1						
SY134	DYS224	303	13						
SY86	DYS148	232	3						
SY84	DYS273	177	4						

**Figure 9.** Tableaux notant l’absence/présence de chaque STS pour tous les échantillons testés.

### I.7.3. Analyse du polymorphisme *CAT-262C/T* (rs1001179)

Le génotypage de *CAT-262C/T* (rs1001179) a été effectué par la méthode de PCR à allèle spécifique (AS- PCR) comme le décrit **Khodayari *et al*, (2013)**.

**Tableau 09.** Sondes utilisés pour le génotypage de *CAT-262C/T*.

Sens sauvage	5'-GCCCTGGGTTTCGGCTATC-3'
Sens mutée	5'-GCCCTGGGTTTCGGCTATT-3'
Anti sens	5'-GGTTTGCTGTGCAGAACACT-3'

**Tableau 10.** Composition du mix PCR pour le génotypage de *CAT-262C/T*.

Mix	Concentration/ Mix 1	Concentration/ Mix 2	Volume µl / tube PCR
Ampliqon master mix (Promega)	1X	1X	12.5
Sonde sauvage sens (Gene link USA)	/	0.3 µM	1.5
Sonde mutée sens (Gene link USA)	0.3 µM	/	1.5
Sonde anti sens (Gene link USA)	0.3 µM	0.3 µM	1.5
H2O nucléase free (Biolabs)	/	/	8
MgCl <sub>2</sub> (Biolabs)	0.35 µM	0.35 µM	0.5
ADN	40 ng	40 ng	1

**Tableau 11.** Conditions de la PCR Pour le génotypage de *CAT-262C/T*.

Etape	Temps	Température °c	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	5 min	95	1
Dénaturation	30 s	95	38
Hybridation	30 s	62	38
Elongation	30 s	72	38
Elongation finale	5 min	72	1

Les produits obtenus de chaque mix ont subi une migration par électrophorèse sur gel d'agarose (2%) immergé dans un tampon TBE (1X) ; (10.9 g/L Tris-HCl, 5.56g/L acide Boric,

0.93g/L EDTA.Na<sub>2</sub>, complétant le volume à 1 litre avec de l'eau distillée ; pH 8.0) qui contient 0.5µg/ml de Bromure d'Ethidium. La migration a été faite à 100V pendant 2h et le gèle a été finalement visualisé sous UV.

La longueur des fragments est estimée par rapport à un marqueur de taille de 100 pb et l'identification des bandes est faite en présence de contrôles positifs et négatifs. Après visualisation ; un fragment d'une longueur de 340 pb a été obtenue à partir des 2 mixes si l'échantillon est hétérozygote CT, uniquement à partir du mix sauvage si le génotype est homozygote sauvage CC et uniquement du mix muté si le génotype est homozygote muté TT.

#### I.7.4. Analyse du polymorphisme *SOD3* 362G/A (rs 77 2536512)

##### ➤ Génotypage de *SOD3* 362G/A

La détection du polymorphisme de *SOD3*362A a été réalisée par une PCR-RFLP. Les sondes ont été créées spécifiquement pour la première fois à l'aide de la base de donnée NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), le site Filter DNA bioinformatic ([http://www.bioinformatics.org/sms2/filter\\_dna.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/filter_dna.html)) et le IDT integrative DNA technologie (<https://eu.idtdna.com/pages/scitools>). Le choix des sondes a été confirmé sur le site prime 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Ces deux sondes ont été obtenues et ont donné des amplifications optimales.

**Sens : 5'- ATCCGAGACATGTACGCCAA -3'**

**Anti sens : 5'- AAGCTGCCGGAAGAGGAC -3'**

**Tableau 12.** Composition du mix PCR pour le génotypage de *SOD3* 362G/A.

Mix	Concentration/ tube de PCR	Volume µl /tube de PCR (25%µl)
Ampliqon master mix	1X	12.5
Sonde sens	0.16 µM	0.8
Sonde anti sens	0.16 µM	0.8
H2O	/	7.65
DMSO	0.35 µM	0.75
ADN	40 ng	1

**Tableau 13.** Conditions de la PCR pour le génotypage de *SOD3* 362G/A.

Etape	Temps	Température	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	5 min	95	1
Dénaturation	30 sec	95	40
Hybridation	30 sec	65	40
Elongation	30 sec	72	40
Elongation finale	5 min	72	1

### ➤ Digestion Enzymatique

L'enzyme Utilisée est l'endonucléase *BSSHII*, elle possède un seul site de restriction pour le fragment amplifié. Cette enzyme a été choisie et utiliser pour la première fois dans notre travail pour l'étude de ce polymorphisme en particulier (*SOD3* 362G/A).

Dans des tube à PCR, nous avons mis 0.5  $\mu\text{L}$  (soit 10U/ $\mu\text{L}$ ) de l'enzyme *BSSHII*, 2.5  $\mu\text{L}$  du tampon R et 22  $\mu\text{L}$  du produit amplifiée pour obtenir un volume final de 25  $\mu\text{L}$  par réaction. La réaction est incubée à 37°C pendant 16h.

### ➤ Electrophorèse

20  $\mu\text{L}$  de produit de digestion sont déposés dans un puits sur le gel d'agarose à 3%, une migration électrophorétique est effectuée à 100 V pendant 2h, et en fin, les bandes obtenues sont révélées sous UV.

Les produits de la digestion enzymatique sont visualisés sur gel d'agarose (3%) avec 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Bromure d'Ethidium dans un tampon TBE 1X (10.9 g/L Tris-HCl, 5.56g/L acide Boric, 0.93g/L EDTA. Na<sub>2</sub>, complétant le volume a 1L avec de l'eau distillée ; pH 8.0).

**Tableau 14.** Génotypes et longueurs de fragments obtenus après digestion enzymatique avec l'endonucléase *BSSHII*.

SOD	Génotype	Longueur du fragment
Homozygote sauvage	GG	91 + 70
Homozygote muté	AA	159
Hétérozygote	GA	159 + 91 + 70

### I.8. Analyse statistique

Les analyses statistiques sont effectuées avec les logiciels ; IBM SPSS20 pour Windows et le GraphPad Prism 5.

Les différences entre les moyens des deux variables continues sont évaluées par le test t de Student. Le test  $\chi^2$  est utilisé pour les variables qualitatives, pour évaluer la distribution des génotypes et calculer les fréquences alléliques des polymorphismes étudiés et si les SNPs étudiés sont dans l'équilibre de Hardy Weinberg (HWE).

La corrélation de Pearson est utilisée pour rechercher des associations possibles entre les différents paramètres spermatiques, la fragmentation de l'ADN et les activités enzymatiques étudiées ainsi qu'avec le taux de MDA. L'association entre l'infertilité masculine et les génotypes étudiés est estimée sur la base d'un rapport de probabilité (OR) et d'un intervalle de confiance (IC) à 95% en utilisant une analyse de régression logistique multi-variée. La valeur de  $P \leq 0,05$  est considérée statistiquement significative.

Les différences de concentrations séminales de CAT et SOD entre les porteurs des trois génotypes a été analysée par ANOVA suivie du test de Tukey après avoir testé la normalité et l'homogénéité de la distribution des variances dans les trois groupes en utilisant le test de Leven ( $P = 0,691$ ,  $P = 0.241$  respectivement).

*Chapitre II*  
*Résultats et discussion*

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication : Nour El Houda Bousnane, Sadiq May, Mouloud Yahia & Abed Alkarem Abu Alhaija (2017) Association of *CAT-262C/T* with the concentration of catalase in seminal plasma and the risk for male infertility in Algeria. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **63** (5) : 303-310. (Annexe 8).

### II.1. Caractéristiques générales de la population étudiée

Au cours de cette étude épidémiologique transversale de type cas témoin, différents aspects cliniques, physiopathologiques et génétiques de l'infertilité masculine ont été étudiés. Ainsi, plusieurs facteurs de risques potentiels pouvant contribuer à une baisse de la fertilité naturelle de l'homme ont été analysés et à plusieurs niveaux ; démographique, biochimique, cytologique et moléculaire.

Notre échantillon comprend 299 sujets (168 cas et 131 témoins), l'âge moyen des cas est de  $36.51 \pm 6.172$  ans avec des extrêmes allant de 27 à 54 ans, cependant l'âge moyen de la population témoin est de  $36.36 \pm 6.842$  ans avec des extrêmes allant de 23 à 50 ans. Il n'y a pas de différence significative entre la distribution de l'âge des deux groupes étudiés ( $p = 0.778$ ) (tableau 15). Ce résultat est expliqué par le mode de recrutement de la population étudiée qui a sélectionné une forte proportion d'hommes jeunes (la plupart de nos sujets se situent dans une tranche d'âge de 30 ans à 40 ans, ce qui correspond bien à la classe d'âge où la majorité des couples désirent concevoir un enfant, mais aussi à la classe d'âge où il est encore peu probable de déceler des modifications au niveau des paramètres spermiologiques et de statut oxydatif liées à ce facteur.

L'absence de différence d'âge entre les deux groupes est en faveur du type de notre étude qui nécessite d'être en possession d'un nombre de patients atteints de la pathologie à étudier (infertilité masculine), et un nombre proche de témoins (sains). Ces deux cohortes «cas » et « témoins » doivent être les plus possibles similaires aux niveaux de l'âge.

Des résultats proches ont été signalés par **Haiba et al. (2014)** qui ont mené une étude à Oran, où ils ont trouvé que l'âge moyen du groupe infertile idiopathique et le groupe témoin était respectivement,  $31,03 \pm 4,94$  et  $31,30 \pm 3,95$  ans. De ce fait, les différences entre les groupes n'étaient pas statistiquement significatives. De même, **Boushaba et belaloui (2015)** ont noté une moyenne égale à  $37.50 \pm 0.88$  ans chez des hommes infertiles candidats de l'injection intracytoplasmique au niveau de la wilaya de Constantine. Par contre, une autre étude menée à Oran par

**Fizazi et al. (2015)** a signalé que l'âge des hommes infertiles est de  $40.39 \pm 7.59$  ans, une moyenne bien supérieure à celle que nous avons noté.

**Tableau 15.** Caractéristiques générales de la population étudiée.

Caractéristiques	Cas (n=168)	Témoins (n=131)	P
Age (Années) (Moyenne $\pm$ SD)	36.51 $\pm$ 6.17	36.36 $\pm$ 6.84	0.778
BMI (Kg/m <sup>2</sup> ) (Moyenne $\pm$ SD)	25.84 $\pm$ 4.05	27.160 $\pm$ 3.42	0.003
Cigarette			
Oui (n)	76	59	<0.001
Non (n)	92	72	
Type de l'infertilité			
Primaire (n)	133		
(%)	(79.16%)	/	
Secondaire (n)	35		
(%)	(20.84%)	/	
Durée de l'infertilité (Moyenne $\pm$ SD)	3.77 $\pm$ 2.60	/	/

P significatif quand  $\leq 0.05$

Les cas inclus dans cette étude proviennent tous de la région de Batna et ses environs (les Aurès), et cela pour éliminer toute implication des facteurs géographiques et/ou ethniques sur les résultats de l'étude et pour respecter le contexte d'une étude cas témoin.

Nous avons recensé 133 sujets qui présentent une infertilité primaire et 35 sujets qui présentent une infertilité secondaire soit des pourcentages respectifs de 79.16% et 20.84%. Le taux des cas consultants pour une infertilité primaire est presque quatre fois plus élevé que celui des consultants pour une infertilité secondaire. Ce constat est similaire que celui rapporté à Oran par **Fizazi et al. (2015)** qui ont trouvé que 82% des cas sont des infertiles primaires. Ce pourcentage important peut être expliqué par la tendance des hommes n'ayant jamais d'enfants à s'inquiéter plus et à consulter plus fréquemment que les autres pour traiter leurs infertilités.

La durée moyenne de l'infertilité de notre échantillon est de  $3.77 \pm 2.60$  ans, une durée qu'on peut classer comme courte, ce qui reflète une amélioration de la psychologie des hommes infertiles envers ce problème et une progression dans la capacité à assumer leurs infertilités et à consulter un

médecin dans des délais plus au moins courts. Dans le Nord Ouest Algérien **Fizazi et al. (2015)** ont noté une durée d'infertilité de  $5.20 \pm 3.75$  ans, une moyenne supérieure à celle de notre échantillon.

## II.2. Résultats de l'étude cyto-spermiologique et de l'intégrité de l'ADN spermatique

**Tableau 16.** Caractéristiques spermiologiques des sujets malades et des témoins.

Paramètres	Cas (n=168)	Témoins (n=131)	P
Ph	$7.50 \pm 0.10$	$7.66 \pm 0.21$	0.563
Volume (mL)	$3.38 \pm 1.46$	$4.05 \pm 1.39$	<0.001
Mobilité (%)	$36.54 \pm 27.68$	$61.77 \pm 18.09$	<0.001
Vitalité (%)	$43.17 \pm 27.78$	$61.78 \pm 18.35$	<0.001
Concentration ( $10^6$ /mL)	$31.17 \pm 38.57$	$42.48 \pm 27.73$	0.005
Morphologie typique (%)	$14.09 \pm 11.82$	$32.12 \pm 9.72$	<0.001
Leucocytes ( $10^6$ /mL)	$0.66 \pm 0.12$	$0.52 \pm 0.11$	0.427
fragmentation d'ADN (%)	$22.04 \pm 11.49$	$18.82 \pm 4.06$	0.002

P significatif quand  $\leq 0.05$

Une série de comparaisons entre les différents paramètres déterminant la qualité spermatique des cas et des témoins a été réalisée, aussi le taux de fragmentation de l'ADN spermatique des sujets infertiles et des témoins fertiles a été analysé (tableau 16).

Concernant les paramètres macroscopiques, le volume moyen de sperme chez les hommes infertiles est de ( $3.38 \pm 1.46$  mL), le groupe control présente un volume moyen de ( $4.05 \pm 1.39$  mL), il existe une différence significative entre les deux groupes ( $p < 0.001$ ), mais les valeurs restent dans les normes de l'OMS 2010. Par contre, il n'y a aucune différence entre le PH du sperme des hommes infertiles et des témoins fertiles ( $p = 0.234$ ).

Selon les résultats de comparaison des paramètres microscopiques, et à l'exception du pourcentage des leucocytes ( $0.66 \pm 0.12$  vs  $0.52 \pm 0.11$   $10^6$ /mL  $p = 0.427$ ), tous les paramètres spermiologiques testés montrent des différences significatives entre les hommes infertiles et les témoins fertiles ( $p \leq 0.05$ ).

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés sur la population Oranaise, ou la concentration de spermatozoïdes, le pourcentage de la mobilité, le pourcentage de formes normales et le volume dans le groupe infertile étaient significativement plus faibles que dans le groupe témoin **Haiba et al. (2014)**. Les valeurs signalées par cette étude sont très comparables aux nôtres, sauf le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux, qui a été supérieur que celui

de notre échantillon, que ce soit pour le groupe infertile ( $50.05 \pm 18.15$  vs  $14.09 \pm 11.82$  %) ou le groupe témoin ( $59.16 \pm 7.65$  vs  $32.12 \pm 9.72$  %).

D'autres chercheurs se sont aussi intéressés à la comparaison des profils spermiologiques entre les deux groupes dans différents pays, **Wijeratna et al. (2005)** ; **colagar et al. (2009)** ; **Marbut et al. (2011)** et **Fahmida (2014)**, ils ont signalé que la concentration des spermatozoïdes, la mobilité, le pourcentage de formes typiques, et le volume chez le groupe infertile étaient significativement plus faibles par rapport aux témoins, ce qui est en accord avec nos résultats.

Par contre, l'étude de **Boushaba et Belaloui (2015)**, sur des hommes infertiles candidats de l'injection intra cytoplasmique au niveau de la région de Constantine, a rapporté des valeurs différentes. Le volume moyen était  $2.85 \pm 0.26$  mL, la concentration spermatique était  $15.46 \pm 15.02 \times 10^6$  /mL, la mobilité des spermatozoïdes était  $46.14\% \pm 3.27\%$  et en fin, 50% des patients infertiles avaient 30% ou plus de SPZ avec morphologie normale.

À partir de ces résultats, les paramètres spermatiques de notre population sont au même niveau que ceux dans différentes régions Algériennes et même dans d'autres pays que ce soit pour le groupe des hommes infertiles ou pour le groupe témoin.

Chez notre groupe infertile, le pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté est de  $22.04 \pm 11.49$  %, alors que chez le groupe témoin, il est de  $18.82 \pm 4.06\%$ . La différence entre les deux groupes est hautement significative ( $p = 0.002$ ).

Dans l'étude de **Boushaba et Belaloui (2015)**, tous les patients infertiles avec des profils spermiologiques anormaux ont présenté des taux élevés de la fragmentation de l'ADN (DFI >18), ce qui indique que des pourcentages importants de fragmentation d'ADN des spermatozoïdes est souvent liée à une infertilité couplée aux défauts des paramètres spermatiques.

Certains auteurs ont signalé que l'intégrité de l'ADN du sperme est significativement associée à la réussite d'achever une grossesse (**Collins et al., 2008**). Par ailleurs, **Tandara et al. (2014)** ont montré qu'une valeur DFI de  $\leq 28\%$  dans le test Halosperm peut être un bon paramètre pronostique d'achever une grossesse et la même chose pour une Valeur de DFI de  $\leq 30\%$  dans le test SCSA rapporté par **Evenson et al. (1999)**.

L'ADN du sperme est l'ADN le plus compact subissant de nombreuses modifications épigénétiques dans la structure de la chromatine pendant la spermatogenèse (**Ward et Coffey 1991**). Tous ces stades de réorganisation assurent la protection de la chromatine spermatique pendant la transmission à travers l'appareil reproducteur masculin et féminin (**Sakkas et al., 1999**). Etant donné que l'ADN du sperme contribue avec 50% au génome du zygote, l'intégrité de l'ADN d'un spermatozoïde fertilisant est essentielle pour assurer une fertilité optimale et un développement embryonnaire normal et sain. L'intégrité de l'ADN du sperme est donc un paramètre important du potentiel reproducteur masculin et de la qualité du sperme (**Agarwal et Allamaneni 2004**).

Les origines des dommages de l'ADN des spermatozoïdes éjaculés, sont un remodelage de la chromatine par la topoisomérase, le stress oxydatif et l'apoptose. La fragmentation de l'ADN du sperme peut apparaître à la suite d'un ou d'une combinaison de ces différents mécanismes (**Aitken et De Iuliis 2010**). Il a été prouvé que l'ADN endommagé a une influence sur la fertilité naturelle et même sur les cycles de procréation médicalement assistée (**Larson et al., 2000 ; Spano et al., 2000**).

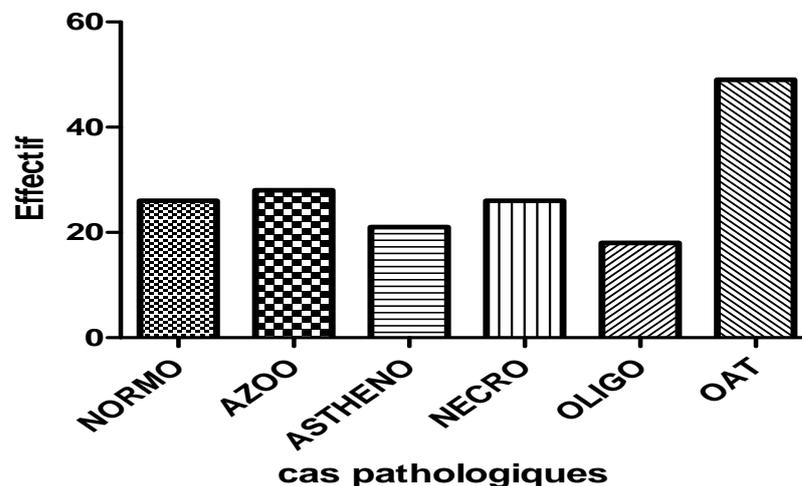
La majorité des cas d'infertilité de notre échantillon (84.53% des hommes infertiles) est témoignée par une diminution de la qualité du sperme, non pas seulement de la concentration des spermatozoïdes, de leur vitalité et du pourcentage de la motilité, mais également de la morphologie de spermatozoïdes est remarquée.

Les résultats de spermogramme et de spermocytogramme révèlent que parmi les 168 hommes infertiles recrutés, uniquement 15.47% patients sont normozoospermes (n=26), le reste présentent des cas pathologiques différents ; 16.66% azoospermes (n=28), 12.5% asthénozoospermes (n=21), 15.47% necrozoospermes (n=26), 10.71% oligozoospermes (n=18) et 29.16% oligo-asthéo-tératozoospermes (n=49) (figure 10). Ces patients sont classés en fonction des anomalies détectées lors d'analyses spermologiques, tout en suivant les critères de l'OMS 2010.

L'analyse de distribution des fréquences de différentes anomalies spermatiques montre que l'oligo-asthéo-tératospermie est la plus rencontrée avec une fréquence de 29.16%. Cette valeur est proche à celles rapportée par **Ounis (2014)** dans la région de Constantine qui a déclaré un pourcentage de 25,7%. L'asthénozoospermie dans notre étude présente un taux de 12.5%, un pourcentage bien inférieur que celui de l'étude **d'Ounis (2014)** qui a trouvé 20,5% de cas présentant cette anomalie.

Dans notre échantillon, la normozoospermie représente 15.47% du groupe infertile, ce pourcentage est inférieur à celui rapporté par **Fizazi *et al.* (2015)** qui ont noté 29% des cas infertiles avec spermogrammes et spermocytogrammes normaux.

Tous les témoins présentent bien évidemment des profils spermiologiques normaux, mais qui restent quand même bas par rapport aux normes de l’OMS, ce qui reflète une diminution globale de la qualité de sperme chez notre population et dans différents pays. Cette diminution est devenue une préoccupation mondiale, plusieurs auteurs ont lié la dégradation de la qualité de sperme chez l’homme au mode et au régime de vie, à l’utilisation des différentes technologies modernes comme le téléphone portable, à la pollution et surtout au stress oxydatif (**OMS 2010 ; Agarwal *et al.*, 2011 ; Agarwal *et al.*, 2014**).



**Figure 10.** Distribution des sujets infertiles selon les cas pathologiques de spermogramme et de spermocytogramme.

### III.3. Résultats de l’étude des profils hormonaux

Nous avons effectué une exploration hormonale chez tous les sujets infertiles et les témoins fertiles, elle comprend un dosage de FSH, de LH, de testostérone et de prolactine. Cette exploration de première ligne est essentielle car elle permet de dépister des atteintes primitivement testiculaires (insuffisances testiculaires primitives, ITP) responsables d’azoospermie, d’oligospermie ou d’OAT. Un grand nombre d’ITP se traduisent en effet par une élévation anormale de la FSH, ce qui permet déjà de préciser le niveau testiculaire de l’atteinte et d’écarter les causes pré et post-testiculaires (**Young 2016**). Ces dosages hormonaux nous ont aussi permis de dépister de façon efficace les

hypogonadismes hypogonadotropes (HH) (**Salenave et al., 2012 ; Boehm et al., 2015**). Dans les HH avec oligospermie ou azospermie, la formule hormonale a été souvent caricaturale et associe une baisse simultanée, nette, à la fois de la FSH, de la LH et de la testostérone. Dans ce cas, les dosages précédents ont été complétés par un dosage de la prolactine (**Young 2016**).

Tous les sujets avec des profils hormonaux pathologiques, qui révèlent des insuffisances testiculaires ou des HH, ont été exclus de l'étude (10 cas). Les patients inclus présentent des variations dans les taux des hormones mais qui restent dans les normes de l'OMS (**2010**).

Les figures (11, 12, 13, 14) montrent les niveaux d'hormones de tous les sujets inclus dans cette étude ; 168 infertiles et 131 témoins. Les niveaux de FSH et de LH sont significativement plus élevés chez les cas infertiles par rapport aux témoins fertiles ( $9.61 \pm 3.11$  vs  $5.65 \pm 2.33$  et  $5.34 \pm 2.49$  vs  $4.13 \pm 1.70$  mU/mL  $p < 0.001$ ). Cependant, pour la testostérone, elle présente des niveaux plus élevés chez le groupe témoin par rapport aux cas ( $5.47 \pm 2.69$  vs  $7.23 \pm 3.21$  ng/mL,  $p < 0.001$ ). Concernant les niveaux de la Prolactine aucune différence n'est observée entre les deux groupes étudiés ( $15.84 \pm 3.95$  vs  $14.92 \pm 5.94$ ,  $p = 0.109$ ).

Nos résultats concordent avec ceux déclarés par **Chellat (2013)** à Constantine, qui a noté que les niveaux de FSH et de LH sont significativement plus élevés chez les infertiles que chez les hommes fertiles ( $14.34 \pm 4.27$  vs  $5,48 \pm 1,66$  mU/mL,  $p = 0,001$  et  $8,03 \pm 2,58$  vs  $4,91 \pm 1,27$  mU/mL,  $p = 0,005$  respectivement). Le taux de testostérone est plus faible chez le groupe infertile par rapport au groupe fertile ( $3,13 \pm 1,13$  vs  $7,47 \pm 1,74$  ng/mL,  $p = 0,006$ ). **Chellat (2013)** a aussi signalé une différence au niveau des taux de FSH et de LH, mais les valeurs déclarées par cette étude sont supérieures à celles que nous avons notées. Cela peut être expliqué par le fait que cette dernière a inclus exclusivement des infertiles azospermes et oligozoospermes.

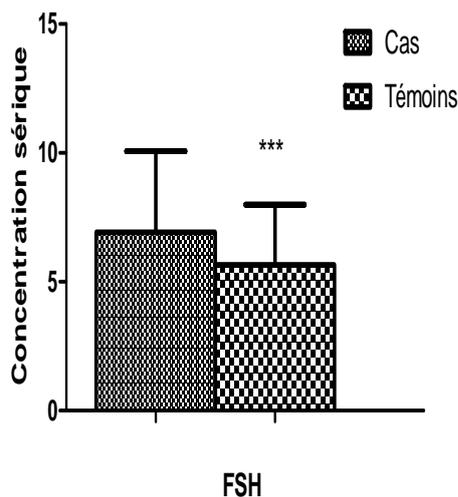
Ces résultats sont aussi en accord avec ceux de **Wijeratna (2005)** qui a déterminé l'effet des hormones de la reproduction sur la qualité des spermatozoïdes chez des hommes qui cherchent un traitement de l'infertilité. L'auteur a signalé des niveaux sériques de FSH et LH significativement plus élevés chez la population infertile et des taux de Testostérone significativement plus faibles chez les sujets malades par rapport aux sujets sains. Il n'a pas trouvé une différence dans les niveaux moyens de PRL entre les deux groupes. **Koşar et al. (2010)** ont aussi rapporté une différence significative des moyennes de FSH, LH en comparant des hommes fertiles et infertiles. Par contre, **Antonio et al. (2009)** n'ont trouvé aucune différence entre les taux de FSH,

LH et Prolactine entre des hommes souffrant d'une infertilité de différentes origines et des témoins fertiles.

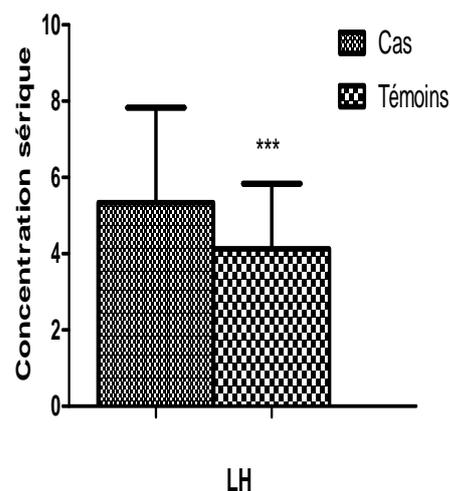
L'étude menée en Tunisie par **Moez *et al.* (2015)** a montré une différence dans les taux de FSH entre des hommes infertiles et des témoins fertiles, les valeurs des dosages étaient respectivement ;  $14.52 \pm 11.05$  vs  $7.22 \pm 3.14$  U/mL, Par ailleurs, aucune différence des niveaux de LH n'a été déclaré.

Des études menées par **Balkans *et al.* (2008)** et par **Wang *et al.* (2010)** ont également montré un taux plus élevé de FSH et de LH chez les hommes atteints d'insuffisance spermatique sévère.

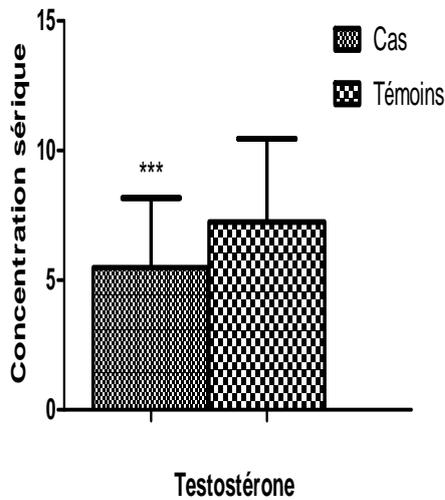
Peu d'études se sont intéressées à l'exploration de la prolactine dans l'infertilité masculine et le rôle physiologique de la PRL dans cette pathologie n'est pas bien établis, mais l'effet de l'hyperprolactinémie est bien démontré (**Aleem *et al.*, 2005**), elle affecte le liquide séminal à travers différents mécanismes causant l'arrêt de la spermatogenèse et des défauts de la mobilité et de morphologie des spermatozoïdes (**Antonio *et al.*, 2009**).



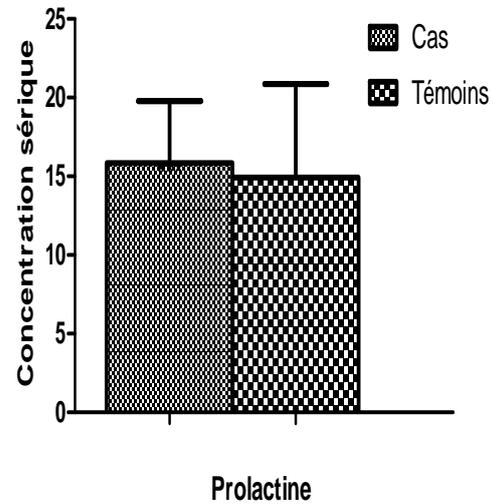
**Figure 11.** Comparaison des taux de FSH entre les sujets infertiles et les témoins



**Figure 12.** Comparaison des taux de LH entre les sujets infertiles et les témoins



**Figure 13.** Comparaison des taux de testostérone entre les sujets infertiles et les témoins



**Figure 14.** Comparaison des taux de prolactine entre infertiles et témoins

#### II.4. Résultats de l'évaluation du statut oxydatif du plasma séminal

**Tableau 17.** Activités séminales des enzymes antioxydantes et du MDA des cas et des témoins.

Paramètres	Témoins (n=131) Moyenne± SD	Cas (n=168) Moyenne± SD	P
SOD (U/mL)	156.33 ±49.46	83.37± 34.86	<0.001
CAT (U/mL)	17.61 ± 4.48	12.58 ± 5.64	<0.001
GPX (U/L)	2400.82 ± 849.37	2106.71 ± 757.98	0.02
MDA (nmol/mL)	1.620 ± 0.53	1.795 ± 0.60	0.007

P significatif quand  $\leq 0.05$

Nos résultats montrent que l'activité du SOD dans le plasma séminal est fortement diminuée chez les hommes infertiles par rapport aux témoins fertiles (tableau 17), ce qui est en accord avec les résultats de plusieurs auteurs (Murawski *et al.*, 2007; Zelene *al.*, 2010; Ramya *et al.*, 2011 ; El

**Azzawie et al., 2014**) et confirme le rôle important de cette enzyme dans le maintien du potentiel de fertilité chez l'homme. Cependant, peu d'auteurs n'ont signalé aucune différence dans l'activité du SOD entre les infertiles et les témoins fertiles (**Zini et al., 1993 ; Tavidani et al., 2008; Vinita 2013**).

Le tableau 17 montre l'existence d'une différence significative de l'activité du GPx entre les deux groupes. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Al-Azzawie et al. (2014)** qui ont constaté que l'activité du GPX était plus faible dans le plasma séminal du groupe infertile que celui des témoins fertiles. **Giannattasio et al. (2002)** ont déclaré que l'activité du GPX séminal des sujets sains était 10 fois supérieure à celle des hommes infertiles. Par contre, **Tramer et al. (2004)** n'ont noté aucune différence au niveau de l'activité de cette enzyme entre des hommes infertiles et des témoins fertiles.

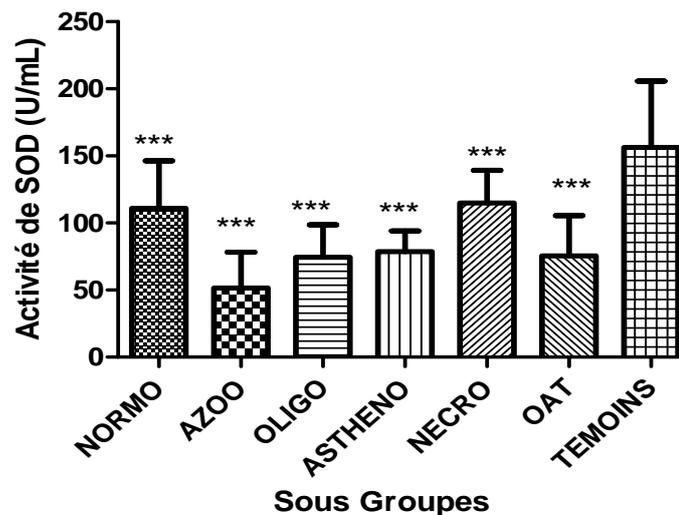
L'activité séminale du CAT chez les témoins est statistiquement plus élevée par rapport à celle notée chez les cas ( $17.61 \pm 4.48$  U / mL et  $12.58 \pm 5.64$  U / mL respectivement,  $P < 0.001$ ). Ces différences sont aussi rapportées par **Khosrowbeygi et al. (2004)** qui ont déclaré qu'un état altéré du CAT peut avoir un rôle important dans l'étiologie du dysfonctionnement spermatique. Nos résultats ont également soutenu ceux de **Zelen et al. (2010)**, dans lesquels ils ont montré que des donneurs fertiles avaient des activités séminales du CAT significativement plus élevées que des hommes infertiles. Contrairement à nos résultats, **Zini et al. (2000)** n'ont signalé aucune différence dans les activités de cette enzyme entre les deux groupes.

Ces résultats contradictoires des activités enzymatiques entre les différentes études pourraient être attribués d'une part aux nombreuses variables telles que le fond génétique, la taille de l'échantillon, l'âge et l'IMC des sujets étudiés, et d'autre part, aux critères d'inclusion et d'exclusion, aux méthodes analytiques utilisées par chaque étude et au temps d'abstinence et qui peut fortement modifier la composition du plasma séminal.

En ce qui concerne l'étude du marqueur de la peroxydation lipidique et du stress oxydatif, le MDA, sa concentration est notée plus élevée chez les sujets infertiles ( $1.795 \pm 0.607$  nmol/mL) par rapport aux témoins fertiles ( $1.620 \pm 0.533$  nmol/mL), et la différence entre ces moyennes est statistiquement significative ( $P = 0.007$ ).

Ce résultat concorde avec une autre étude réalisée en Algérie par **Haiba et al. (2014)**, qui ont signalé des niveaux de MDA séminal plus élevés chez le groupe infertile ( $1.31 \pm 0.03$  nmol/mL) que chez les fertiles ( $0.77 \pm 0.06$  nmol/mL), par contre les taux de MDA détectés chez notre

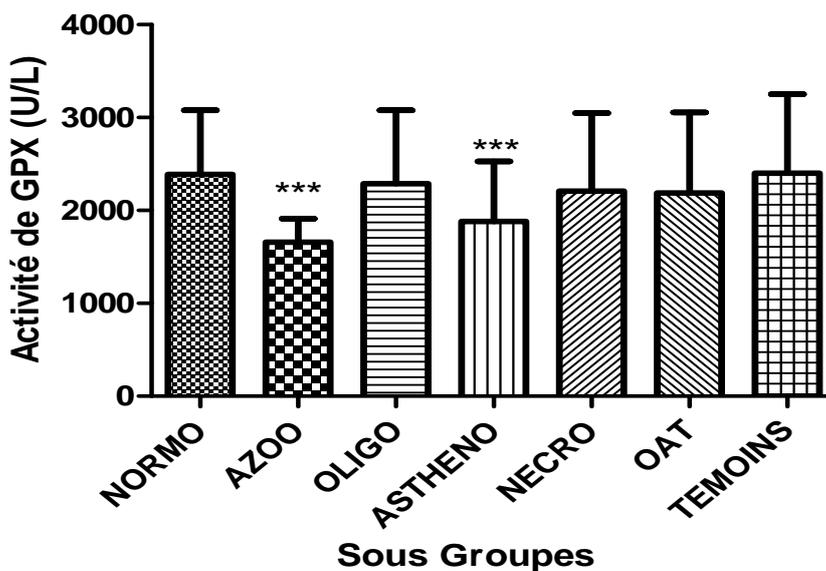
échantillon sont plus élevés que ceux rapporté par la même étude, que ce soit chez les cas ou chez les témoins. **Colagar et al. (2009)**, **Marbut et al. (2011)** et **Atig et al. (2012a)** ont aussi trouvé un taux de MDA plus élevé chez le groupe infertile comparativement au groupe fertile (28.70 vs 18.89  $\mu\text{mol/l}$ ,  $P<0.001$ ), (6.01  $\mu\text{mol/l}$  vs 3.45  $\mu\text{mol/l}$ ,  $P<0.01$ ) et (0.94 nmol/ml vs 0.65 nmol/ml,  $P<0.001$ ) respectivement.



**Figure 15.** Activité enzymatique séminale de la SOD des sous groupes infertiles

La figure 15, montre que la diminution de l'activité séminale du SOD est une tendance générale de notre échantillon, on remarque que, par rapport au groupe témoin, elle a été significativement diminuée ( $P\leq 0.001$ ) chez tous les sous groupes des hommes infertiles y compris les Normozoospermes.

La diminution de l'activité séminale du SOD peut entraîner une accumulation d' $\text{O}_2^-$  et indirectement une peroxydation lipidique membranaire excessive qui est responsable de la diminution de la motilité des spermatozoïdes (**Jones et al., 1979 ; Drevet 2006 ; Agarwal et al., 2008b**) ce qui est confirmé par les quantités importantes de MDA trouvées dans le plasma séminal des sujets infertiles comparés aux témoins. Ces résultats montrent que le dosage de la SOD dans le plasma séminal pourrait être un outil utile pour déterminer le potentiel de fécondation des spermatozoïdes et pourrait être un des outils de diagnostic de l'infertilité masculine idiopathique.



**Figure 16.** Activité enzymatique séminale du GPX des sous groupes infertiles

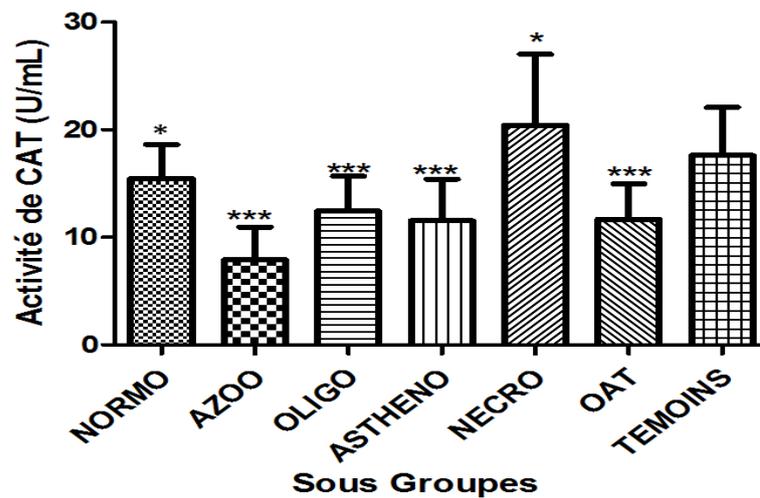
La figure 16 montre que parmi les six sous groupes étudiés, uniquement deux sous groupes montrent des différences de l'activité du GPX, il s'agit de l'azoospermie ( $P \leq 0.001$ ) et l'Asthénospermie ( $P=0.008$ ) et cela on les comparant aux témoins.

L'inhibition spécifique des GPX *in vitro* induit une forte peroxydation lipidique des spermatozoïdes, suggérant un rôle important de cette famille d'enzymes (**Drevet 2006 ; Vernet et al., 2004**). L'action du GPX sur la membrane du spermatozoïde confère une protection des constituants lipidiques, préservant ainsi la vitalité et la mobilité des spermatozoïdes.

Le glutathion est le principal protecteur contre les dégâts liés aux radicaux libres et maintient les antioxydants exogènes dans leur forme réduite. Combiné à un apport de vitamines C et E, une augmentation de la numération des spermatozoïdes et une diminution de la fragmentation de L'ADN ont été observées (**Methorst et al., 2014**). La Réduction de GPX dans le plasma séminal peut conduire à une réduction de la capacité de fertilisation des spermatozoïdes et aussi à une mauvaise qualité du sperme (**Hall et al., 1998**).

Malgré le nombre important des études qui confirment la grande différence au niveau des activités du GPX séminal entre des hommes infertiles et des témoins fertiles, et également le fait que la réduction du GPX dans le plasma séminal peut conduire à la réduction de la capacité du fertilisation et la qualité du sperme (**Hall et al., 1998**), cette enzyme séminale n'est pas encore

considérée comme un outil utile pour déterminer le potentiel de fécondation des spermatozoïdes et donc de fertilité de l'homme. Cela peut être dû au nombre réduit des cas utilisés dans chaque étude ou aux interactions complexes entre les ERO et de nombreux antioxydants (Tramer *et al.*, 2004 ; Hsieh *et al.*, 2006 ; Atig *et al.*, 2012a).



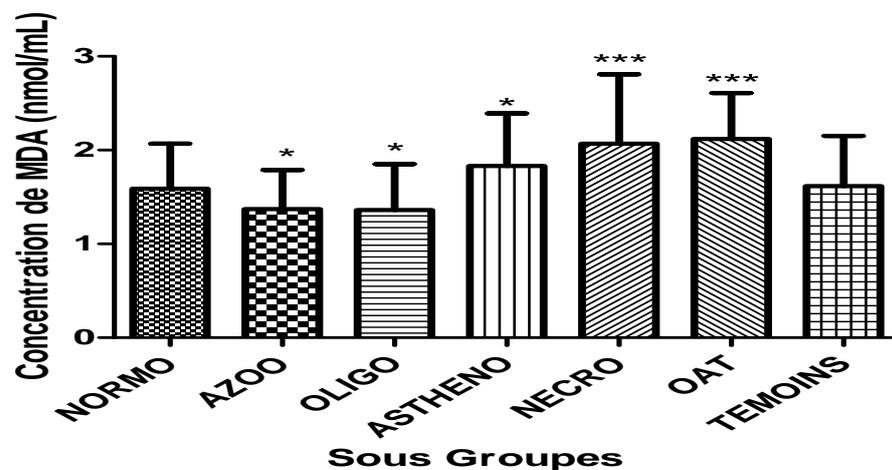
**Figure 17.** Activité enzymatique séminale de la CAT des sous groupes infertiles

Selon la figure 17, l'activité séminale basse de la CAT est aussi une tendance générale dans notre population masculine infertile, une diminution significative dans l'activité de cette enzyme est observée chez cinq sous-groupes par rapport aux témoins ( $p < 0,05$ ).

La différence significative dans l'activité du CAT dans le plasma séminal entre les hommes infertiles et les témoins ( $P < 0,001$ ) et entre les six sous groupes infertiles et le groupe témoins ( $p < 0,05$ ) est biologiquement raisonnable et met en évidence le rôle capital de la CAT dans le processus de détoxification des ERO et dans la protection de l'intégrité des spermatozoïdes.

Nos résultats concordent avec ceux de **Ramya *et al.* (2010)** qui ont observé que les activités CAT étaient atténuées dans le plasma séminal de tous les sous groupes infertiles. **Al-Azzaoui *et al.* (2014)** ont également observé une diminution significative de l'activité séminale de CAT chez deux sous-groupes; L'oligozoospermie sévère et l'asthénozoospermie par rapport au groupe témoin. Par contre **Tavilani *et al.* (2008)** n'ont noté aucune différence dans les concentrations du CAT dans le plasma séminal des patients asthénozoospermes et des témoins normozoospermes.

Dans l'ensemble, l'activité séminale importante de CAT dans le groupe témoin et sa diminution accrue chez les cas, et spécialement chez tous les sous-groupes des hommes infertiles a confirmé la contribution positive du CAT comme un antioxydant puissant pour maintenir une bonne qualité des spermatozoïdes, ce qui pourrait être un outil utile dans la gestion de l'infertilité masculine. Cette hypothèse est en accord avec de nombreuses données de la littérature, qui indiquent que la CAT fournit la protection antioxydante la plus efficace contre les effets des radicaux libres lorsque des spermatozoïdes sont incubés dans des systèmes produisant des radicaux oxygène (Gagnon 1991; Aitken *et al.*, 1993; Plante *et al.*, 1994).



**Figure 18.** Concentration séminale de MDA des sous groupes infertiles et du groupe témoin.

Concernant l'étude des taux de MDA chez les sous groupes infertiles (Figure 18), nous avons remarqué que le contenu séminal en MDA est visiblement plus élevé chez trois sous groupes. Deux ont montré la plus grande différence avec le groupe témoin, il s'agit de la Nécrozoospermie et l'OAT.

La nécrozoospermie est souvent liée à un problème oxydatif à cause de l'excès des espèces réactives de l'oxygène dans le plasma séminal qui conduit à l'inhibition de la capacité et la viabilité des spermatozoïdes en raison de la peroxydation des acides gras polyinsaturés de la membrane, ce qui génère la perte de la fluidité membranaire des spermatozoïdes qui est nécessaire pour la fusion avec l'ovule (Aziz *et al.*, 2004). Une étude a montré que les spermatozoïdes des patients infertiles présentant les niveaux augmentés d'ERO avaient des taux sensiblement plus élevés d'apoptose que les spermatozoïdes du groupe control (Agarwal et Said 2003). Les ERO peuvent également induire une fragmentation de l'ADN et activer la voie de signalisation mitochondriale de l'apoptose (Pons-Rejraji 2009).

L'OAT est une anomalie spermatique multiple, qui englobe trois perturbations majeures (de nombre, de mobilité et de morphologie). Les spermatozoïdes immobiles et/ou morphologiquement anormaux sont des cibles d'attaques par les ERO, en raison des défauts observés au niveau de leurs membranes cytoplasmiques, ce qui cause une élévation remarquable des taux de MDA généré par la peroxydation lipidique.

Nos résultats concordent avec une étude menée en Tunisie par **Ben Ali et al. (2012)**, qui ont trouvé une concentration moyenne séminale en malondialdéhyde significativement plus élevée chez le groupe asthénospermiques que chez les témoins (3.52 µg/l vs 2.32 µg/l). Ils ont aussi signalé que la mobilité diminue avec l'augmentation de la concentration du malondialdéhyde par une corrélation négative ( $r=-0.24$ ;  $p\leq 0.01$ ).

**Ben abdellah et al. (2009)** ont aussi trouvé que le taux séminale en MDA est statistiquement plus élevé chez les asthénozoospermes et les oligozoospermes par rapport aux témoins normozoospermes. Notre constat est aussi en accord avec les travaux d'**Atig et al. (2012a)** qui ont montré que la peroxydation lipidique est élevée chez les hommes ayant une qualité médiocre des spermatozoïdes.

Les deux sous groupes, L'azoospermie et l'oligospermie présentent des taux de MDA significativement inférieurs à celui des témoins ( $p=0.025$ ,  $p=0.05$  respectivement). Ce résultat peut être expliqué par le fait que le MDA est généré suite à une attaque des membranes spermatiques par les ERO, donc l'absence totale des spermatozoïdes ou bien leurs faibles nombre conduisent à une production minimal de ce marqueur de la peroxydation lipidique.

Les taux élevés de MDA dans le plasma séminale des hommes infertiles, de notre échantillon représentent les effets pathologiques de la peroxydation lipidique sur la membrane des spermatozoïdes et par conséquent sur les principaux paramètres spermiologiques ; la morphologie, la mobilité et la vitalité des cellules spermatiques. De nombreuses données de la littérature indiquent que la peroxydation lipidique est le principal mécanisme des dommages oxydatifs des spermatozoïdes, elle est considérée comme la cause majeure des dysfonctions dans le sperme humain chez des infertiles idiopathiques.

La quantité importante en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la membrane des spermatozoïdes augmente sa vulnérabilité vis-à-vis les attaques par les ERO, phénomène pouvant entraîner de graves dommages, d'une part au niveau de la membrane plasmique, d'autre part au niveau de l'ADN. Les ERO ont généralement une affinité importante à l'électron libre des doubles

liaisons des AGPI donnant naissance à des espèces moléculaires lipidiques instables (**Laudat et al., 1999**).

Lorsque les ERO attaquent les acides gras polyinsaturés au niveau de la membrane plasmique, elles déclenchent une chaîne de peroxydation lipidique où un composé porteur d'un électron non apparié réagira avec un autre composé pour produire un électron non apparié, L'un des produits intermédiaires de ces réactions est le malondialdéhyde (MDA) qui se fixe sur les bases de l'ADN et les endommage (**Haiba et al., 2014**).

Les niveaux élevés de MDA séminale représentent l'augmentation des taux de peroxydation des lipides, ce qui diminue la fertilité (**Agarwal et al., 2003 ; Hesham et al., 2008**), et cela suite à des atteintes de l'intégrité de la membrane spermatique qui conduit à une inhibition complète de la mobilité et du métabolisme énergétique des spermatozoïdes (**Zelen et al., 2010**).

Les AGPI les plus sensibles aux ERO sont l'acide arachidonique et l'acide docosahexaénoïque (DHA) (**Griveau et al., 1995**). L'oxydation du DHA est un facteur majeur de baisse de la mobilité des spermatozoïdes *in vitro*. Les conséquences de cette baisse en DHA dans la membrane plasmique sont l'augmentation de la rigidité membranaire, la baisse de la mobilité des spermatozoïdes et la baisse de la capacité fumigène avec la membrane ovocytaire (**Aitken et al., 1989 ; Alvarez et Storey 1995**). Cette diminution de la fluidité pourrait affecter le transport membranaire et donc affectera la viabilité du sperme (**colagar et al., 2009**).

Par ailleurs, les ERO ont la capacité d'induire des oxydations des bases ce qui provoque une fragmentation de l'ADN (**Keskes Ammar et al., 2003**).

La diminution claire de la défense antioxydante enzymatique dans le plasma séminal de notre population infertile et les quantités importantes du MDA dans leur plasma séminal suggèrent qu'un déséquilibre du statut oxydatif induit une mauvaise qualité du sperme et confirment la contribution et l'impact du statut oxydatif sur le potentiel de fertilité masculine et par conséquent peuvent expliquer la perte de fertilité des hommes représentant notre échantillon d'étude.

### II.5. Résultats de l'étude des associations entre le statut oxydatif séminal, les paramètres spermologiques et la fragmentation de l'ADN spermatique.

**Tableau 18.** Corrélations entre les concentrations en CAT, SOD, GPX et le contenu du MDA avec les paramètres spermologiques et la fragmentation d'ADN.

patients	SOD	CAT	GPX	MDA	Controls	SOD	CAT	GPX	MDA
SC	r 0.458	0.421	0.127	0.031	SC	r 0.035	-0.005	-0.056	-0.077
	p <0.001	<0.001	0.103	0.693		P 0.688	0.951	0.523	0.375
PM	r 0.489	0.470	0.215	0.107	PM	r 0.074	0.112	0.046	0.035
	p <0.001	<0.001	<b>0.005</b>	0.169		p 0.400	0.201	0.598	0.688
TM	r 0.444	0.319	0.171	0.088	TP	r 0.022	0.140	-0.072	0.078
	p <0.001	<0.001	<b>0.027</b>	0.256		p 0.800	0.111	0.411	0.375
VIT	r 0.297	0.166	0.191	0.084	VIT	r 0.118	0.137	-0.027	0.074
	p <0.001	<b>0.031</b>	<b>0.013</b>	0.279		p 0.179	0.119	0.757	0.399
DF	r 0.034	0.158	0.130	0.353	DF	r -0.044	0.051	0.070	-0.008
	p 0.662	0.051	0.94	<0.001		p 0.615	0.560	0.424	0.927

Chez les hommes infertiles, nous avons constaté que l'activité de SOD est positivement corrélée avec tous les paramètres de sperme étudiés (tableau 18), ce qui est en accord avec de nombreuses études telles que (Shamsi *et al.*, 2010; Macanovic *et al.*, 2015) et ce qui consolide les résultats mentionnés dans la figure 15, ou tous les sous groupes des hommes infertiles avec différentes pathologies avaient des activités significativement diminuées de leur SOD séminal par rapport aux témoins. Conformément à nos résultats, Marzec-Wróblewska *et al.*, (2010) ont déclaré la présence d'une corrélation négative entre le pourcentage des formes atypiques et l'activité séminale de SOD. Atig *et al.* (2012a) ont aussi noté des corrélations positives entre l'activité séminale de SOD et la concentration et mobilité des spermatozoïdes.

L'activité importante de SOD séminal dans le groupe témoin et les corrélations positives observées entre cette enzyme et la qualité du sperme démontrent la capacité de cette enzyme antioxydante d'éliminer  $O_2^{\bullet-}$ , et son rôle biologique important dans le contrôle du potentiel fécondant des spermatozoïdes (Al-Azzawie *et al.*, 2014).

Dans notre étude, la fragmentation de l'ADN n'est pas corrélée avec l'activité séminale du SOD. Ce résultat s'explique par l'activité externe de cette enzyme qui exerce sa fonction en dehors des cellules spermatiques, de sorte que, même si elle protège les spermatozoïdes des attaques des ERO externes, elle ne peut être directement impliquée dans la protection de l'ADN. Ce résultat s'explique également par la nature de l'ADN spermatique qui est fortement emballé et condensé de manière à conférer une protection supplémentaire à cette molécule.

L'infertilité masculine pourrait être attribuée à une fonction altérée des spermatozoïdes ou à une morphologie de sperme anormale. Étant donné que, d'une part, les spermatozoïdes humains sont riches en acides gras polyinsaturés et sont donc sensibles à l'attaque des radicaux libres médiés par la peroxydation des lipides membranaires et, d'autre part, SOD est l'une des principales enzymes du système de défense contre les ERO et prévention de la peroxydation des acides gras polyinsaturés dans la membrane cytoplasmique (**Vinita 2013**), il semble que la diminution de l'activité de SOD dans le plasma séminal des hommes infertiles soit en fait une cause de la fonction inhibée et de la morphologie endommagée des spermatozoïdes ; De sorte qu'il peut s'agir d'une cause majeure des cas inexplicables d'infertilité masculine chez notre population d'étude.

L'étude des corrélations (tableau 18) montre que la concentration de CAT dans le plasma séminal des hommes infertiles est positivement associée aux critères les plus importants de la capacité fertilisante normale des spermatozoïdes; Concentration de sperme ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,458$ ), vitalité du sperme ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,297$ ), mobilité du sperme ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,498$ ) et pourcentage de la morphologie typique du sperme ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,444$ ) Mais pas avec la fragmentation de l'ADN du sperme ( $p = 0,122$ ,  $r = 0,106$ ). Nos résultats sont cohérents avec beaucoup d'autres de la littérature, comme **Sanocka et al. (1997)** ; **Khosrowbeygi et al. (2004)** ; **kawakami et al. (2007)** ; **Samant et al. (2009)**.

À la lumière d'un rôle aussi important de la CAT dans le plasma séminal pour le fonctionnement des spermatozoïdes, l'expression du gène CAT ainsi que le produit de ce gène dans le plasma séminal ont été trouvés en association avec certains paramètres de qualité du sperme tels que la morphologie du sperme et la mobilité progressive (**Macanovic et al., 2015**). Cependant, l'absence de toute association entre la CAT séminale et l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes dans nos résultats et ceux de **Hammadeh et al. (2008)**, s'explique par un effet de la protection additionnelle de l'emballage serré d'ADN de sperme assurée par des protamines qui le rendent plus résistant aux attaques de radicaux libres que l'ADN des autres types de cellules (**Olivia 2006**).

D'après le tableau 18, il existe des corrélations positives entre l'activité séminale de GPX et la mobilité, la vitalité et le pourcentage de formes typiques. Ce résultat est similaire à celui trouvé par **Atig et al. (2012)** qui ont noté des corrélations hautement significatives entre l'activité de GPX et la mobilité ( $p=0.04$  ;  $r=0.263$ ) et avec la concentration spermatique ( $p<0.001$  ;  $r=0.470$ ). **Dandekar et al. (2002)** et **Hseih et al. (2006)** ont également rapporté une forte corrélation entre l'activité séminale de cette enzyme et la mobilité des spermatozoïdes. Ces associations renforcent le rôle bénéfique de GPX dans l'élimination des ERO et par conséquent dans la préservation d'une bonne qualité de sperme.

Les corrélations fortes et positives notées entre les activités séminales du SOD, CAT et GPX confirment le rôle important de ces derniers dans le maintien de la qualité spermatique, mais il est toutefois difficile de conclure l'efficacité d'un antioxydant isolé d'un autre parce qu'il semble y avoir une coopération. Ces associations notées à la fois soutiennent l'effet concomitant de ces enzymes contre les effets délétères des peroxydations lipidiques et du stress oxydatif qui affecte la qualité du sperme.

Concernant l'étude des corrélations entre le taux en MDA et les paramètres spermatiques (tableau 18), aucune association n'est détectée. Ce résultat est en désaccord avec ceux de **Suleiman et al. (1996)** ; **Kobayashi et al. (1997)** ; **Ben abdallah et al. (2009)**, **Zelen et al. (2010)** ; **Atig et al. (2012)** qui ont établis des corrélations significatives entre le contenu séminal en MDA et la mobilité des spermatozoïdes chez des hommes infertiles.

Par contre une corrélation hautement significative est observée entre le MDA et le taux des spermatozoïdes à ADN fragmenté ( $p < 0.001$   $r = 0.353$ ).

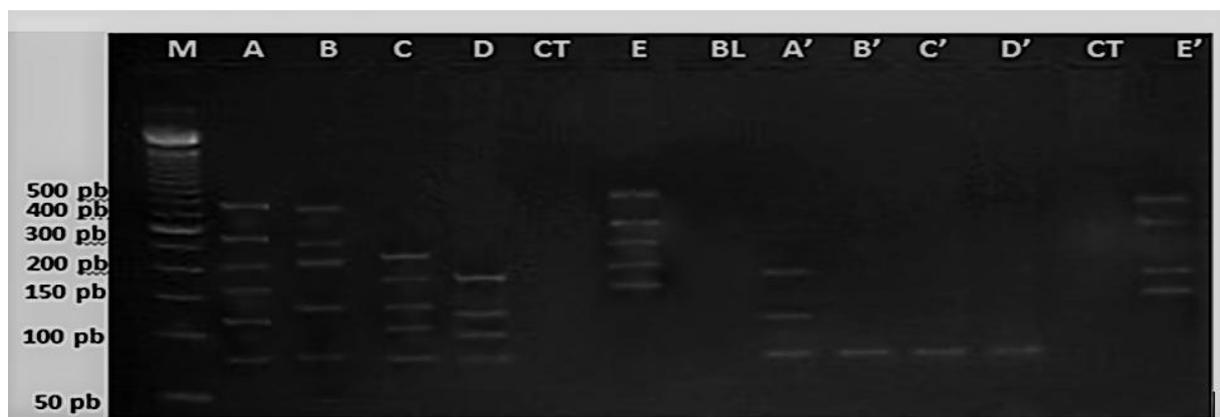
Les spermatozoïdes sont particulièrement sensibles à la peroxydation lipidique pour plusieurs raisons, telles que la composition de leurs membranes cytoplasmiques très riches en acides gras poly insaturés, le très faible niveau d'enzymes antioxydantes cytoplasmiques et le manque de mécanismes de réparation de l'ADN dans les cellules spermatiques, (**Agarwal et al., 2008**). A la lumière des données précédentes et en raison de la forte potentialité d'interaction d'ERO avec le matériel génétique, on peut justifier la corrélation observée entre le MDA et le taux des spermatozoïdes à ADN fragmenté, donc on conclue que la peroxydation lipidique chez les infertiles cause principalement la fragmentation des acides nucléiques, ce qui conduit à une altération et un dysfonctionnement des cellules spermatiques conduisant à une perte de la fertilité.

## II.6. Résultats de l'étude moléculaire

### II.6.1. Résultats du screening des micro-délétions du chromosome Y

Nous avons exploré la possibilité de l'existence de microdélétions du chromosome Y chez les patients infertiles, afin d'éliminer tout sujet qui présentent cette aberration chromosomique. Nous avons utilisé un kit qui permet de détecter les trois régions AZFa, AZFb et AZFc par une PCR multiplexe. Les trois loci AZF sont explorés en utilisant des amorces STS spécifiques à chaque région du chromosome Y (Figure17).

Quatre-vingt seize sujets infertiles (29 Azoospermes, 18 oligozoospermes et 49 OAT) et 5 témoins fertiles normozoospermes ont été candidats du screening des microdélétions du chromosome Y. Parmi ces cas, un seul sujet Azoosperme a présenté cette aberration chromosomique (1/96) et c'était au niveau des deux régions AZFb et AZFc. Aucune délétion n'a été détectée chez les témoins. Ci-dessous le profil électrophorétique des résultats obtenus (Figure 17).



**Figure19.** Photographie du profil électrophorétique d'un témoin sain et d'un patient azoosperme avec des microdélétions au niveau des régions AZF du chromosome Y. M : représente un marqueur de taille d'ADN à l'échelle de 50pb. A, B, C, D, E : représentent les produits d'amplification de l'ADN d'un témoin fertile, A', B', C', D', E' : représentent les produits d'amplification de l'ADN du patient azoosperme, BL : puits vide, CT, CT' : contrôles négatifs contenant des multiplexes mixes sans ADN.

La figure 19 montre les résultats du screening des microdélétions du chromosome Y du patient azoosperme, on remarque l'absence des bandes qui correspondent aux STS ; SY130, SY157, SY254 au niveau du multiplexe mix A. SY208, SY242, SY127 et SYPR3 au niveau du multiplexe

mix B. SY255, SY145, SY121 et SY128 au niveau du multiplexe mix C. SY124, SY152 et SY133 au niveau du multiplexe mixe D. SY134 au niveau du multiplexe mix E.

Nous n'avons remarqué aucune délétion au niveau de la zone AZFa qu'est en générale associée à un syndrome « *Sertoli cell only* » de type I avec absence de cellules germinales. Par contre la délétion complète de la zone AZFb chez le patient azoosperme est justifiée, car par définition, elle est associée à un blocage de la spermatogénèse ce qui conduit à une azoospermie. La délétion complète de la zone AZFc induit de multiples phénotypes, pouvant aller de l'azoospermie à l'oligozoospermie (Vogt *et al.*, 1996). Une évolution négative de la fertilité a été remarquée chez les patients porteurs d'une délétion de la région AZFc allant d'une oligospermie sévère vers une azoospermies (Kim 2001 ; Sharlip *et al.*, 2002 ).

Enfin, il est important de préciser que ces liaisons entre génotype et phénotype ne sont valables que lorsque la délétion est complète. En effet, en cas de délétions partielles d'une région, ou de délétions affectant plusieurs régions, tous les phénotypes allant de l'azoospermie jusqu'à l'oligozoospermie pourront aussi bien être retrouvés (De Vries *et al.*, 2002 ; Luetjens *et al.*, 2002). Par conséquence, il est possible de dire que la sévérité du trouble de la fertilité de le patient azoosperme est uniquement en fonction des délétions identifiées.

Dans ce travail, nous avons constaté que 1.05% des cas étudiés présentent des microdélétions du chromosome Y. D'autres études ont rapporté des fréquences variables allant de 1,3 à 55% (Osterlund *et al.*,2000; Foresta *et al.*, 2001; Chiang *et al.*, 2004). Notre constat est inférieur à la valeur déclarée précédemment par des études menées en Tunisie (6.85%, 1.9% et 9.5%) Rejeb *et al.* (2008), Hammami *et al.* (2014) et Moez *et al.* (2015), une étude au Maroc (18.85%) Naas *et al.* (2015), en Jordanie (8.3%) Khabour *et al.* (2014), en Egypte (12%) El Awady *et al.* (2004) et même dans différents pays de l'Asie et de l'Europe (Najmabadi *et al.*, 1996; Silber *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999; Simoni *et al.*, 2004).

Dans la majorité de ces études, les microdélétions ont été essentiellement détectées chez les cas azoospermes et ont été localisées principalement dans les deux régions AZFb et AZFc ce qui est conforme à nos résultats.

Nos résultats sont proches à ceux trouvés par la seule étude Algérienne déjà menée par Chellat *et al.* (2013) qui ont signalé un pourcentage de 1.3% de microdélétions du chromosome Y (soit un seul patient azoosperme parmi 80 sujets azoosperme et oligozoospermes étudiés).

De nombreux facteurs peuvent expliquer cette grande variation de résultats de fréquences des microdélétions et de leur localisation au niveau du chromosome Y, tels que les différences ethniques et géographiques (**Krausz *et al.*, 2003**), les critères d'inclusion des sujets infertiles, les aspects méthodologiques et le nombre et le choix des STS pour la recherche des microdélétions du chromosome Y.

### II.6.2. Etude des polymorphismes génétiques

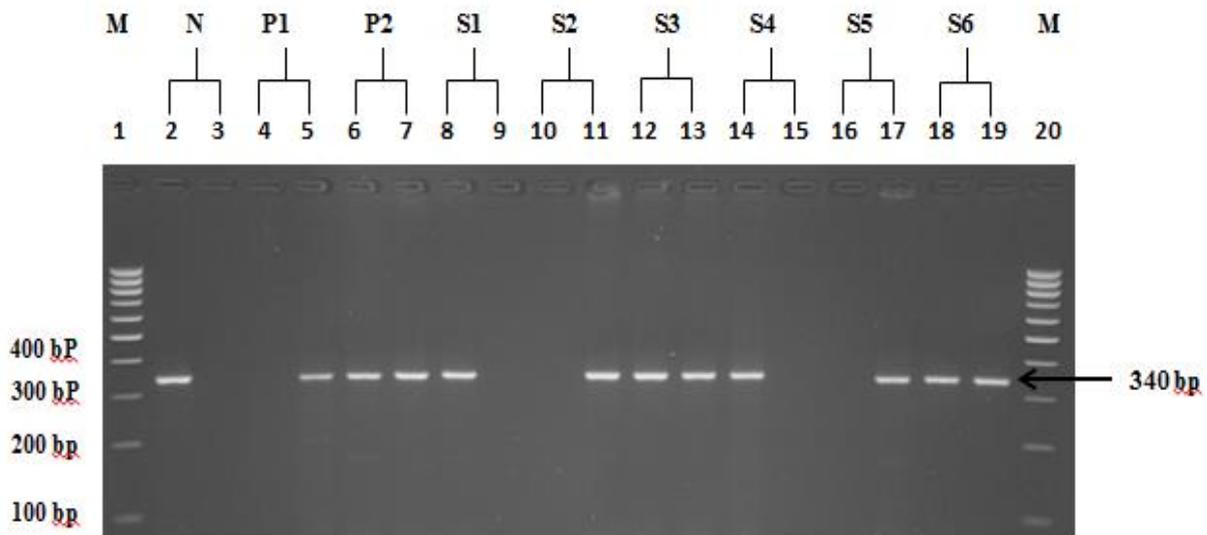
A cause des conditions de la manipulation et l'état des échantillons, l'étude moléculaire des polymorphismes génétiques et leur impact sur l'infertilité masculine, ainsi que l'étude d'associations entre les différents polymorphismes et les activités enzymatiques ont été réalisées uniquement sur 111 cas et 104 témoins (57 cas et 27 témoins sont omis de cette partie de l'étude).

Étant donné l'implication du SOD et de la CAT dans un grand nombre de pathologies y compris l'infertilité masculine, nous avons recherché, une relation entre une infertilité idiopathique et des polymorphismes constitutionnels au niveau des gènes codant ces enzymes impliquées dans la détoxification des radicaux libres et dans le maintien d'un équilibre oxydatif. Nous avons ainsi étudié les variantes ; -262C/T du gène *CAT* et 362G/A du gène *SOD3*. Ces polymorphismes ont été choisis parmi ceux qui peuvent être potentiellement délétères pour la fertilité masculine et aussi pour l'activité enzymatique concernée.

#### II.6.2.1. Résultats de l'étude de polymorphisme *CAT*-262C/T (rs1001179)

Nous avons analysé le polymorphisme -262C/T au niveau du promoteur du gène *CAT* chez 111 hommes infertiles et 104 témoins fertile par une PCR à allèle spécifique (AS-PCR). Les résultats représentatifs de génotypage pour le locus -262C/T du gène *CAT* par électrophorèse sur gel d'agarose sont représentés dans la figure 25.

Les fréquences alléliques et génotypiques de SNP *CAT*-262C/T (rs1001179) chez les cas et chez les témoins sont représentés dans le tableau 19. Les fréquences alléliques sont en équilibre de HW ( $p > 0,05$ ) dans les deux groupes étudiés. Il n'y a pas de différence significative dans la distribution des allèles ou de génotypes entre les hommes infertiles et les témoins fertiles ( $p > 0,05$ ). Ce résultat est en désaccord avec celui rapporté par **Sabouhi *et al.* (2015)** qui ont mené une étude sur des homme infertiles et des témoins fertiles Iraniens, il ont déclaré que les porteurs du génotype *CAT*-262T/T sont moins susceptibles d'être touché par l'infertilité.



**Figure 20.** Photographie d'un gel d'électrophorèse qui montre Les résultats du génotypage de *CAT-262C/T*.

Puits 1 et 20 (M) ; marqueurs de taille d'ADN à l'échelle de 100 pb. S1 à S6 représentent des échantillons de nos résultats. N représente un contrôle négatif (CC). P2 représente un contrôle positif de l'hétérozygote (CT). P1 représente un contrôle positif de l'homozygote (TT). Pour chaque contrôle et tous les échantillons représentatifs, les puits gauche (nombres paires) contiennent les produits de PCR amplifiés à l'aide de l'amorce de type sauvage, tandis que les puits droits (nombres impaires) contiennent des produits d'amplification utilisant une amorce mutée.

En ce qui concerne le dépistage des différents génotypes *CAT-262C/T* dans notre échantillon ( des hommes originaires de la wilaya de Batna ; Aurès), les sujets porteurs du génotype CC se sont révélés les plus fréquents (tableau 19), suivis respectivement des génotypes CT et TT. Ceci est en accord avec différentes études antérieures sur la population suédoise (52% CC, 31% TT et 7% TT), Allemande (59,8 CC, 34,2% CT et 6% TT) et Russes (69% CC, 25% CT et 6 % TT) (**Forsberg et al. (2001)**; **Zarbock et al. (2007)**; **Komina et al. (2012)**). Alors que dans l'étude iranienne de **Sabouhi et al. (2015)**, le génotype CT a présenté la fréquence la plus élevée dans le groupe des infertiles et dans celui des témoins.

**Tableau 19.** Résultats des fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme *CAT-262C/T* chez les sujets infertiles et les témoins fertiles

<i>CAT</i> Genotypes n (%)	infertiles n (%)	Témoins n (%)	OR	(95% CI) (Lower – Upper)	P- value
CC	77 (74%)	82 (73.9%)		Reference	
CT	24 (23.1%)	25 (22.5%)	0.946	(0.515 – 8.56)	0.946
TT	3 (2.9%)	4 (3.6%)	1.252	(0.271 - 5.776)	0.773
CT+TT	27 (26%)	29 (26.1%)	1.009	(0.653 - 1.560)	0.966
Allele C	178 (85.6%)	189 (85.1%)	0.997	(0.687 - 1.447)	0.988
Allele T	30 (12.4%)	33 (14.9%)	1.033	(0.576 - 1.852)	0.913

OR odd ratio, IC intervalle de confiance, P significatif quand  $\leq 0.05$ .

Nos résultats n'ont montré aucune association entre le polymorphisme *CAT-262C/T* et l'infertilité masculine, mais représentent les premières données de ce type sur une population Algérienne, précisément celle de Batna et pourrait ouvrir la porte à d'autres études et investigations.

### II.6.2.2. Résultats de l'étude du polymorphisme *SOD3 362G/A* (rs77 2536512)

Nous avons analysé un polymorphisme d'un simple nucléotide au niveau du gène *SOD* chez 111 infertiles et 104 témoins par PCR-RFLP. Les résultats représentatifs de génotypage pour le 362G/A du gène *SOD* par électrophorèse sur gel d'agarose sont représentés dans la figure 21.

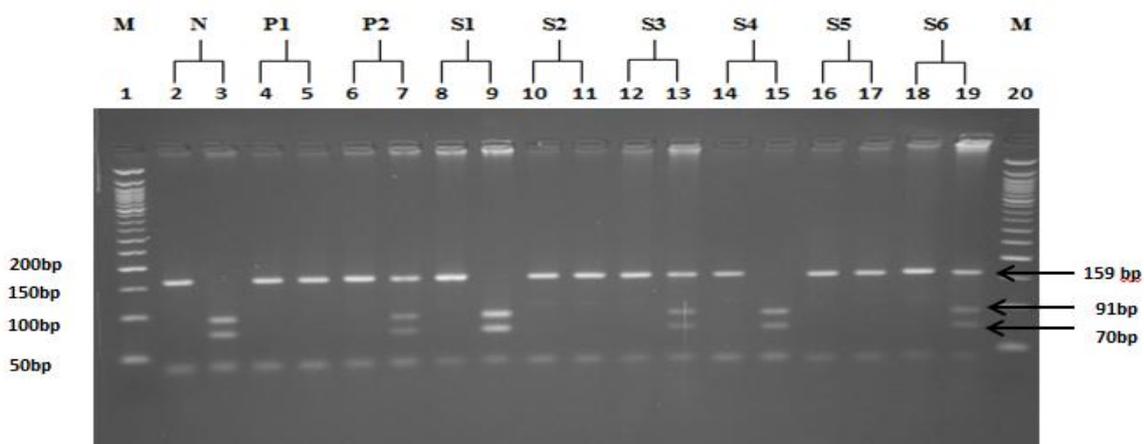


Figure 21. Photographie d'un gel d'électrophorèse représentatif des résultats de génotypage de *SOD3 362G/A*. Puits 1 et 20: maqueurs de taille de l'ADN à l'échelle de 50 pb. N: contrôle négatif (GG). P1: contrôle positif homozygote (AA). P2: contrôle positif hétérozygote (GA). S1 à S6 représentent des échantillons de cette étude, où le puit gauche de chaque échantillon est le produit de PCR non digéré, tandis que les puits droits sont les produits digérés par l'enzyme *BSSIII* des échantillons respectifs.

Les homozygotes de type sauvage, les hétérozygotes, et les mutants homozygotes ont montré respectivement ; deux bandes (91pb et 70 pb), trois bandes (159 et 91 et 70 pb), et une bande (159pb), respectivement, en raison de la production d'un site de coupure pour *BSSIII* par l'allèle G.

Les fréquences alléliques des cas et des témoins sont dans l'équilibre de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ). La répartition des génotypes et des allèles avec l'Odd ratio (OR) pour les cas et les témoins sont résumés dans le tableau 3. Les fréquences des deux allèles G et A et la distribution des différents génotypes (AA, GA et GG) chez les cas et les témoins étaient statistiquement non significatives ( $p > 0,05$ ) (pour GA vs GG: OR = 0,826, IC 95%: 0,439-1,55, P = 0,554; pour AA vs GG: OR = 0,639, IC à 95%: 0,305-1,340, P = 0,235).

Nous n'avons pas trouvé d'association entre le variant étudié du *SOD3* et l'infertilité masculine. Ces données semblent indiquer que ce polymorphisme n'a pas d'impact significatif sur la qualité spermatique, du moins chez les sujets infertiles de notre population.

Une seule étude sur la population chinoise s'est intéressée à l'évaluation de l'effet possible de trois polymorphismes au niveau des gènes *SOD* sur l'infertilité masculine et conformément à nos résultats, aucune association n'a été signalée concernant le polymorphisme *SOD3* 362G/A. Par contre, une association négative a été rapportée à propos d'un autre polymorphisme dans le même gène (rs2695232) (**Ji et al., 2012**). Cependant, les mêmes auteurs ont indiqué que le génotype *SOD2*Val16Ala (rs4880) est associé à un risque significativement plus élevé d'infertilité masculine. Une autre étude française concernant les polymorphismes au niveau du *SOD2* a rapporté que la présence d'au moins 1 allèle Ala-MnSOD (rs4880) augmente significativement le risque d'infertilité chez les hommes (**Faure et al., 2014**).

**Tableau 20.** Fréquences génotypiques et alléliques de polymorphisme *SOD3* 362G/A, (rs 77 2536512) et leurs associations avec l'infertilité masculine.

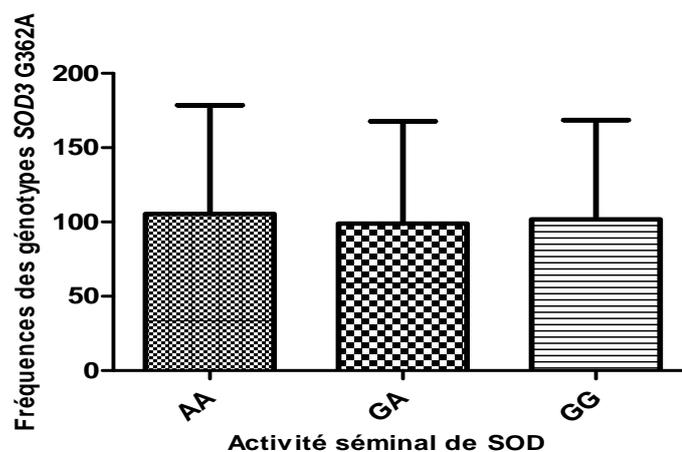
<i>SOD3</i> 362A géotypes	Cas n (%)	Témoins n (%)	OR	(95% CI) (Lower_upper)	P-Value
GA	52 (46.84%)	48 (46.15%)	0.826	(0.43, 1.55)	0.55
GG	36 (32.43%)	28 (26.92%)	/	Referance	/
AA	23 (20.72%)	28 (26.92%)	0.639	(0.30, 1.34)	0.23
Allele G	124 (55.85%)	104 (50%)	0.920	(0.52, 1.60)	0.76
Allele A	98 (44.14%)	104 (50%)	0.725	(0.42, 1.27)	0.26

OR odd ratio, IC intervalle de confiance, P significatif quand  $\leq 0.05$

## II.7. Résultats de l'étude des associations entre génotypes activités séminales

### II.7.1. Résultats de l'étude de l'association entre les génotypes de *SOD3* 362G/A et l'activité séminale SOD

L'activité du SOD séminale était légèrement différente entre les porteurs de différents génotypes de *SOD3* 362G/A, mais chez les hommes infertiles la différence n'a pas atteint un niveau significatif (GG:  $88,715 \pm 39,408$  U / mL, GA:  $84,471 \pm 37,893$  U / mL, AA:  $87,824 \pm 45.051$  U / mL,  $P = 0.875$ ) et de même chez les témoins (GG:  $155.164 \pm 46.557$  U / mL, GA:  $154.880 \pm 50.556$  U / mL, AA:  $152.227 \pm 48.318$  U / mL,  $P = 0.968$ ).



**Figure 22.** Histogramme des activités séminales de SOD chez des cas porteurs de différents génotypes *SOD3* 362G/A

À l'inverse de nos attentes, aucune association n'a été observée entre les génotypes *SOD3* 362G/A et l'infertilité masculine ou avec l'activité séminale de SOD.

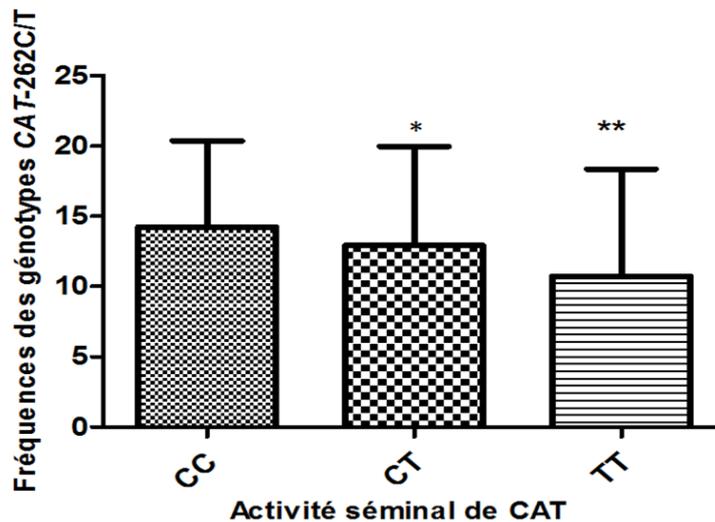
Notre travail, et comme la seule étude menée en ce qui concerne l'association entre ce polymorphisme et l'activité séminale du SOD (**Yan et al., 2014**), n'a révélé aucune influence des différents génotypes du *SOD3* 362G/A sur l'activité enzymatique dans le plasma séminal, mais selon la même étude, il semblait que le polymorphisme *SOD2*Val16Ala (rs4880) a été associée à de faibles activités du SOD.

Le manque d'association entre les génotypes *SOD3* 362G/A et l'activité du SOD séminale et le risque d'infertilité masculine dans notre population peuvent être attribués au nombre limité de sujets, aux critères d'inclusion et d'exclusion ou aux facteurs nutritionnels et environnementaux qui sont des paramètres qui peuvent fortement influencer les résultats.

Il est bien connu que le SOD est présent dans les spermatozoïdes et le plasma séminal (**Mennella et Jones 1980; Zini et al., 1993**) dans trois isoformes (SOD1: CuZnSOD; SOD2: MnSOD; SOD3: ecSOD) et chacun est un produit d'un gènes distinct et a une localisation subcellulaire différente, mais catalyse la même réaction. Cette localisation subcellulaire distincte des isoformes SOD est particulièrement importante pour la signalisation redox (**Fukai et Ushio-Fukai 2011**). Alors que le SOD2 se trouve dans les mitochondries et fournit une protection vitale contre les ERO générées par l'hyperoxie (**Afonso et al., 2007**). Le SOD3 se retrouve principalement dans les compartiments extracellulaires (plasma, lymphatique, liquide céphalo-rachidien et liquide articulaire) (**Fattman et al., 2003**).

Ainsi, l'effet positif de *SOD2* Val16Ala sur l'activité séminale du SOD contre l'absence d'effet du polymorphisme *SOD3* 362G/A semble un peu étrange car *SOD2* est un gène qui code pour l'isozyme endogène contrairement au *SOD3* qui est extracellulaire et que le SOD dans l'étude mentionnée a été mesurée dans le plasma séminal. Nous croyons fermement que l'activité séminale diminuée du SOD peut être le résultat d'une modification génétique au niveau du gène *SOD3*. Une étude avec plus de polymorphismes au niveau de *SOD3*, et spécialement au niveau de la région du promoteur et avec un nombre plus élevé de sujets sera recommandée.

### II.7.2. Résultats de l'étude de l'association entre les génotypes de *CAT*-262C/T et l'activité séminale de la catalase.



**Figure 23.** Histogramme des activités séminales du CAT des cas porteurs des différents génotypes *CAT*-262C/T.

L'activité du CAT est remarquablement différente entre les trois groupes génotypiques,  $12.92 \pm 4.98$  U/mL pour les porteurs de CT et  $10.73 \pm 5.40$  U/mL pour le groupe génotypique TT, elles sont significativement inférieures à l'activité CAT du groupe génotypique CC  $14.23 \pm 4.34$  ( $P=0.042$ ,  $P=0.001$  respectivement).

À notre connaissance, notre étude est la première à chercher la présence d'un lien entre les génotypes *CAT*-262C/T et l'activité du CAT dans le plasma séminal des hommes infertiles. Nos résultats les plus pertinents ont été la détection des concentrations du CAT les plus élevées chez les individus porteurs du génotype sauvage *CAT*-262C/C et des concentrations plus faibles chez les porteurs des génotypes mutés sous ses deux formes ; hétérozygote *CAT*-262CT et homozygote *CAT*-262TT (**Bousnane et al., 2017**). Ceci est en accord avec différentes études dans lesquelles l'activité sanguine du CAT était plus élevée chez les homozygotes CC par rapport à ceux qui portaient l'allèle T soit dans l'état hétéro ou homozygote (**Ahn et al., 2005; Nadif et al., 2005; Perianayagam et al., 2007; Komina et al., 2012**).

L'explication la plus possible et raisonnable de nos résultats dans lesquels l'activité CAT était associée à l'allèle *CAT*-262T pourrait être basée sur la preuve que  $H_2O_2$  est le seul substrat pour la CAT et donc lors d'un stress oxydatif, et en raison de la forte potentialité d'interaction d'ERO avec le matériel génétique (**Gibbons et al., 2006**), il peut considérablement entraîner une

modification génétique capable de causer une modification voir une inactivation enzymatique. Par conséquence, une diminution de l'expression de la CAT chez les porteurs de l'allèle mutant CAT peut entraîner une diminution de l'activité CAT, ce qui est en accord avec les résultats de **Komina et al.(2012)** et **Ji et al.(2012b)** dans lesquels ce polymorphisme mutant *CAT-262C/T* avait été associé à une activité CAT inférieure et donc à des niveaux élevés de ERO. Ceci est également en accord avec le fait qu'un polymorphisme nucléotidique unique situé dans la région du promoteur peut affecter non seulement l'expression de la CAT, mais aussi son activité **Liu et al.(2010)**.

Une telle diminution de l'activité enzymatique du CAT provoque une altération du processus de détoxification des radicaux libres ce qui peut conduire à une formation accrue de radicaux hydroxyle et à un risque élevé pour de nombreux troubles (**Ahn et al., 2005; Mak et al., 2007**) y compris l'infertilité masculine comme nos résultats l'ont indiqué.

D'autres études ont également confirmé les interactions significatives entre plusieurs polymorphismes dans les gènes antioxydants et le risque accru d'infertilité masculine **Ji et al., (2012a)**, mais notre étude reste la première à mettre en évidence l'effet délétère de *CAT-262C/T* sur L'activité de la CAT séminal chez les hommes infertiles. Elle fournit également des preuves que cette enzyme est nécessaire pour protéger la qualité des spermatozoïdes.

## Conclusion

Avec l'augmentation de l'incidence de l'infertilité masculine et la diminution de la qualité du sperme au cours de ces dernières décennies, la santé reproductive de l'homme est devenue une préoccupation de santé publique. Malgré les progrès énormes dans l'évaluation et la compréhension de la physiologie de la reproduction humaine, la cause exacte de l'infertilité masculine reste encore inconnue dans la majorité des cas (près de 50%). Cependant, le nombre d'hommes avec une infertilité idiopathique augmente et les analyses spermiologiques et biochimiques de base ne parviennent pas à identifier le facteur masculin de l'infertilité dans tous les cas. Alors une grande attention a été récemment donnée aux facteurs génétiques et au stress oxydatif, démontrés comme des sources importantes de pathologie de la reproduction chez les hommes.

A travers cette étude, nous avons évalué le statut oxydatif séminal des hommes infertiles idiopathiques à travers le dosage de MDA, marqueur de la peroxydation lipidique, et l'évaluation des activités enzymatiques antioxydantes (le Superoxyde dismutase le Glutathion peroxydase et la Catalase), afin de chercher une éventuelle relation entre le statut oxydatif séminal et les différentes anomalies spermiologiques rencontrées. Par la suite, nous avons étudié deux polymorphismes génétiques de type SNP (simple nucléotide polymorphisme) (*CAT* -262C/T, *SOD3* 362G/A) dans les 2 gènes codants d'enzymes sujettes de notre étude, pour déterminer une association probable entre des variations au niveau de ces gènes et les activités enzymatiques concernées ainsi qu'avec les différents cas d'infertilité masculine inclus dans notre étude.

Nos résultats ont clairement montré que les activités enzymatiques du SOD, CAT et GPX dans le plasma séminal sont fortement diminuées chez les hommes infertiles par rapport aux témoins fertiles, et cette diminution a été une tendance générale de la majorité des sous groupes infertiles. Nos résultats ont aussi révélé que les concentrations du MDA séminal sont significativement plus élevées chez les cas par rapport aux témoins. Les taux élevés du MDA dans le plasma séminal des hommes infertiles, de notre échantillon représentent les effets pathologiques de la peroxydation lipidique sur la membrane des spermatozoïdes et par conséquent sur les principaux paramètres spermiologiques ; la morphologie, la mobilité et la vitalité des cellules spermatiques et même sur la fragmentation de l'ADN spermatique.

L'étude des corrélations a montré que les concentrations du SOD, CAT et GPX dans le plasma séminal des hommes infertiles sont positivement associées aux critères les plus importants pour la capacité fertilisante normale des spermatozoïdes ; concentration de sperme, vitalité, mobilité, pourcentage de la morphologie typique et avec la fragmentation de l'ADN du sperme. Les corrélations fortes et positives qui ont été notées confirment le rôle si important de ces enzymes dans le maintien de la qualité spermatique. Ces associations notées à la fois soutiennent l'effet

concomitant de ces enzymes contre les effets délétères des peroxydations lipidiques et du stress oxydatif affectant la qualité du sperme.

La diminution claire de la défense antioxydante enzymatique dans le plasma séminale de notre population infertile et les quantités importantes du MDA dans leurs plasma séminal, ainsi que les différentes corrélations détectées suggèrent que le stress oxydatif induit une mauvaise qualité du sperme et confirment la contribution et l'impact du stress oxydatif sur le potentiel de fertilité masculine et par conséquent peuvent expliquer l'absence de fertilité chez notre population d'étude. Ces paramètres plasmatiques pourraient être des bio-marqueurs utiles pour l'évaluation des dommages oxydatifs spermatiques.

Notre étude est la première à chercher la présence d'un lien entre les génotypes *CAT-262C/T* et l'activité *CAT* dans le plasma séminal des hommes infertiles. Nos résultats les plus pertinents ont été la détection des concentrations les plus élevées de *CAT* chez les individus portant le génotype sauvage *CAT-262C/C* et des concentrations plus faibles chez les porteurs des génotypes mutés *CAT-262CT* et *CAT-262TT*. Par contre aucune association n'a été détectée entre les différents génotypes *SOD3 362G/A* et l'activité séminale de *SOD*.

Ce travail n'as pas mis en évidence l'effet des variations génétiques de type SNP; *CAT-262C/T* et *SOD3 362G/A* sur l'infertilité masculine, mais représente les premières données sur les fréquences génotypiques et alléliques de ces deux polymorphismes au sein de notre population.

Notre étude est considérée comme un point de départ qui nous va nous orienter vers d'autres problématiques et perspectives, en l'occurrence, la nécessité de l'étude des taux d'expression du gène *CAT* dans le plasma séminal pour confirmer l'association trouvée entre l'allèle mutant au niveau du promoteur de ce gène et la diminution de l'activité de cette enzyme chez les patients infertiles. Egalement, l'étude des autres polymorphismes au sein des gènes codants d'enzymes antioxydantes semble nécessaire et surtout au niveau de la région du promoteur susceptible d'avoir un impact sur les activités enzymatiques concernées.

L'étude des antioxydants non enzymatiques pourrait aussi confirmer nos constats et renforcer les résultats trouvés concernant l'association entre la carence en antioxydants et les anomalies spermiologiques au sein de notre population.

## *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

**Aebi, H. (1984)** Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* **105**: 121–126.

**Afonso, V., Romuald, C., Dragoslav, M., Pascal, C., Abderrahim, L. (2007)** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme* **74** :636–643.

**Agarwal, A and Allamaneni, SS. (2004)** The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol* **56** : 235–245.

**Agarwal, A., Singh, A., Hamada, A., Kesari, K. (2011)** Cell Phones and Male Infertility: A Review of Recent Innovations in Technology and Consequences. *International Braz J Urol* **37**: 432-454.

**Agarwal, A., Saleh R. (2002)** Role of oxidants in male infertility: rationale, significance and treatment. *Urol. Clin. North Am* **29** :817–827.

**Agarwal, A., Said, TM. (2003)** Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* **9**:331-345.

**Agarwal, A., Saleh, RA., Bedaiwy, MA. (2003)** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fert and Steril* **79** : 829-43.

**Agarwal, A., Said, TM. (2004)** Carnitines and male infertility. *Reprod Biomed Online* **8** : 376-84.

**Agarwal, A., Said, TM. (2005)** Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: A clinical approach. *BJU Int* **95**:503-507.

**Agarwal, A., Prabakaran, S A. (2005)** Oxidative stress and antioxidants in male infertility: a difficult balance. *Iran J Rep Med.* **3**: 1-8.

**Agarwal, A., Allamaneni, S. (2006)** Oxidative stress and human reproduction. In: Singh, K. K. (ed.) *Oxidative Stress, Disease and Cancer*. Imperial College Press, New York. pp. 687–703.

**Agarwal, A., Sharma, RK., Nallella, KP., Thomas, AJJr., Alvarez, JG., Sikka, SC. (2006).** Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril* **86**:878–885.

**Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R. (2008).** Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* **59**:2–11.

**Agarwal, A., Deepinder, F., Sharma, RK., Ranga, G., Li, J. (2008a).** Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertil Steril* **89**:124-8.

- Agarwal, A., Marcello, Co., Hussein, A., Rakesh, K. Sharma,RK. (2008b).** Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility. *Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment* : 195-218.
- Agarwal, A., Sharma, RK., Desai, NR., Prabakaran, S., Tavares, A., Sabanegh, E. (2009)** Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology* **73**:461-9.
- Agarwal, A., Gurpriya, V., Chloe, O., Stefan, S du Plessis. (2014).**Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction Ashok. *World J Mens Health* **32**: 1-17.
- Agarwal, A., Nallella, KP., Allamaneni, SS., Said, TM. (2004)** Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* **8**:616-627.
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., Chyatte, MR. (2015)** A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* **26** .13:37.
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A. (2007)** Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine* **74**: 324–329.
- Ahmad, G., Moinard, N., Esquerre-Lamare, C., Mieuxset, R., Bujan, L. (2012).** Mild induced testicular and epididymal hyperthermia alters sperm chromatin integrity in men. *Fertil Steril* **97**:546–53.
- Aitken, R.J and De Iuliis, G.N. (2010)** On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **16**, 3–13.
- Ahn, J., Gammon, M.D., Santella, R.M., Gaudet, M.M., Britton, J.A., Teitelbaum, S.L., et al. (2005)** Associations between breast cancer risk and the catalase genotype, fruit and vegetable consumption, and supplement use. *Am J Epidemiol* **162**: 943–952.
- Aitken, R.J., Harkiss, D., Buckingham, D. (1993)** Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil* **98**: 257–265.
- Aitken, R.J., Buckingham, D.W.A., Carreras., Irvine, D.S. (1996)** Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and spermfunction. *Free Radical Biology and Medicine* **21** : 495–504.
- Aitken, R.J and Clarkson, J.S. (1988)** Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* **9**:367-376.
- Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Hargreave, T.B., Irvine, D.S., Wu, F.C. (1989)** Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *JAndrol* **10**:214-220.

- Aitken, R.J., Bennetts, L.E., Sawyer, D., Wiklendt, A.M., King, B.V. (2005)** Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl* **28**:171-9.
- Aitken R.J., Skakkebaek NE., Roman SD, (2006).**Male reproductive health and the environment. *Med J Aust*;185:414-5.
- Aitken, R.J., Koppers, A.J. (2011)** Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Andro* **13**:36-42.
- Al-Azzawie, H.F., Naeim, M., Saleman, E.D. (2014)** Evaluation of enzymatic and non- enzymatic antioxidant status in seminal plasma of Iraqi Infertile Men. *International Journal of Advanced Research* **2** :158-167.
- Alvarez, J.G., Storey, B.T. (1995)** Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Mol. Reprod. Dev** **42** : 334-346.
- Amory, J.K. (2007)** Drug effects on spermatogenesis. *Drugs of today* **43**:717-24.
- Antonio, M., Roberto, F., Andrea, S., Nicola, N., Vincenzo, D.D., Giuseppe, L.T, Alfredo, P., Elisabetta, M. (2009)** hormonal regulation of total antioxidant capacity in seminal plasma. *J Androl* **30**, 534-540.
- Antonyuk, S.V., Strange, R.W., Marklund, S.L., Hasnain, S.S. (2009).** The structure of human extracellular copper–zinc superoxide dismutase at 1.7 °A resolution: insights into heparin and collagen binding. *Journal of Molecular Biology* **388** : 310–326.
- Armstrong, J.S., Bivalacqua, T.J., Chamulitrat, W., Sikka, S., Hellstrom, W.J. (2002)** A comparison of the NADPH oxidase in human sperm and white blood cells. *Int J Androl* **25**:223-9.
- Arthur, J.R. (2000).** The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* **57**:1825–1835.
- Atig, F., Raffa, M., Habib, B.A., Kerkeni, A., Saad, A., Ajina, M. (2012a)** Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. *BMC Urology* **12**:6.
- Atig, F., Raffa, M., Habib, B.A., Abdelhamid, K., Saad, A., Ajina, M. (2012b)** Altered Antioxidant Status and Increased Lipid Per-Oxidation in SeminalPlasma of Tunisian Infertile Men. *International journal of biological science* **8**:139-149.
- Auger, J and Eustache, F. (2000)** Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie*; **10**:358-72.

- Aziz, N., Saleh, R.A., Sharma, R.K., Lewis-Jones, I., Esfandiari, N., Thomas, J.R., Agarwal, A. (2004)** Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects and the sperm deformity index. *Fertil Steril* **81**:349–54.
- Bedwal, R.S and Bahuguna A. (1994)** Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia* **50** :626–640.
- Badouard, C., Menezo, U., Panteix, G., Ravanat, J.L., Douki, T., Cadet, J., Favier, A. (2008)** Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote* **1** : 9-13.
- Baker, M.A and Aitken, R.J. (2005)** Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol* **3**:67.
- Balkan, M., Tekes, S., Gedik A. (2008)** Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with Oligozoospermia and Azoospermia in Southeast Turkey. *J Assist Reprod Genet.* **25**: 559-565.
- Bansal, A.K and Bilaspuri, G.S. (2010)** Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int* **2011** :7
- Barouki, R and Morel, Y. (2005).** Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress : mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol* **61** : 511-6.
- Barthelemy, C. (2003)** Indications de la recherche des anticorps anti-spermatozoïdes. *Andrologie* **13**:70-80.
- Ben Abdallah, F., Dammak, I., Attia, H., Hentati, B., Ammar-Keskes, L. (2009).** Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in in-fertile men: correlation with semen parameter. *J Clin Lab Anal* **23**: 99-104.
- Ben ali, H., Atig, F., Mehri, S., Saad, A., Ajina, M. (2012)** Analyse du statut oxydatif spermatique chez des patients infertiles. *Andrologie* **22**:233-240.
- Benoff, S., Hurley, I.R., Barcia, M. (1997)** A potential role for cadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. *Fertil Steril* **67**:336–47.
- Berliner, J.A and Heineche, J.W. (1996)** The role of oxidized lipo-proteins in atherogenesis. *Free Rad Biol Med* **20**: 707-27.
- Bhasin, S., Ma, K., De Kretser, D.M. (1997)** Y-chromosomemicrodeletions and male infertility. *Ann Med* **29** :261-3.
- Biswas, N.M., Chaudhuri, A., Sarkar M., Biswas, R. (1996).** Effect of ascorbic acid on *in vitro* synthesis of testosterone in rat testis. *Indian J Exp Biol* **1996** **34** : 612-3.

- Bivalacqua, T.J., Armstrong, J.S., Biggerstaff, J., Abdel-Mageed, A.B., Kadowitz, P.J., Hellstrom, W.J., Champion, H.C. (2003)** Gene transfer of extracellular SOD to the penis reduces O22N and improves erectile function in aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**: 1408–1421.
- Boehm, U., Bouloux, P.M., Dattani, M.T., De Roux, N., Dodé, C, Dunkel, L et al. (2015)** Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* **11** :547-64.
- Boon, E.M., Downs, A., Marcey, D. (2007)** "Catalase: H2O2 : H2O2 Oxidoreductase". Retrieved 2007-02-11.
- Boushaba, S and Belaaloui G. (2015)** Sperm DNA Fragmentation and Standard Semen Parameters in Algerian Infertile Male Partners. *World J Mens Health* **33**: 1-7.
- Butler, A., He, X., Gordon, R.E., Wu, H.S., Gatt, S., Schuchman, E.H. (2002)** Reproductive pathology and sperm physiology in acid sphingomyelinase-deficient mice. *Am J Pathol* **161**:1061-75.
- Burrows, P.J., Schrepferman, C.G., Lipshultz, L.I. (2002)** Comprehensive office evaluation in the new millennium. *Urol Clin North Am* **29**: 873-94.
- Cadet, J., Odin, F., Mouret, J.F., Polverelli, M, Audic, A., Giacomoni, P., Favier, A., Richard, M.J. (1992)** Chemical and biochemical postlabelling methods for singling out specific oxidative DNA lesions. *Mut Research* **275** : 343-354.
- Carrell, D.T and Aston K.I. (2011)** The search for SNPs, CNVs, and epigenetic variants associated with the complex disease of male infertility. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **57** :17–26.
- Carlos Clayton, T.A., An´alia, B.A., Paulo Victor P.A., Rita Neuma D.C.D.A., Edna Maria C.C., Otoni Cardoso, D.V., et al. (2012)** Oxidative Stress and Epilepsy: Literature Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2012** :1-12.
- Céline, F., Charlotte, D., Nathalie, S., Rachel, L. (2011).** Antioxydants et infertilité masculine. *mt Médecine de la Reproduction. Gynécologie Endocrinologie* **13**: 275-83.
- Chellat, D., Rezgoune, M.L., Mc Elreavey, K., Kherouatou, N., Benbouhadja, S., Douadi H., Cherifa, B., Abadi, N., Satta, D. (2013)** First study of microdeletions in the Y chromosome of Algerian infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia. *Urol Int* **90**:455-459.
- Cheng, X., Laura, M., Nelly, P. (2015)** Hypogonadisme chez l’homme *.Forum médical suisse* **15**:218–224

- Chiang, H.S., Yeh, S.D., Wu, C.C., Huang, B.C., Tsai, H.J., Fang, C.L. (2004)** Clinical and pathological correlation of the microdeletion of Y chromosome for the 30 patients with azoospermia and severe oligoasthenospermia. *Asian J Androl* **6**:369-75.
- Choudhary, R., Chawala, V.K., Soni, N.D., Kumar, J., Vyas, R.K. (2010)** Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility. *Pak J Physiol* **6**:54-9.
- Church, D.F and Pryor, W.A. (1990)** Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspec* **87**: 9741-9745.
- Clavert, A., Bourguignat, A., Férard, G. (1999)** Le spermogramme et ses exigences de qualité. *Ann Biol Clin (Paris)* **57**:334-6.
- Cebrian, A., Pharoah, P.D., Ahmed, S., Smith, P.L., Luccarini, C., Luben, R., et al. (2006)** Tagging Single-Nucleotide Polymorphisms in Antioxidant Defense Enzymes and Susceptibility to BreastCancer. *Cancer Res* **66**:1225-33.
- Cocuzza, M., Sikka, S.C., Athayde K.S., Agarwal A. (2007)** Clinical Relevance of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Damage in Male Infertility: An Evidence Based Analysis. *International Braz J Urol* **33**: 603-621
- Coghlan, J.G., Flitter, W., Holley, A.E., Norell, M., Mitchell, A.G., Ilsley, C.D et al. (1991)** Detection of free radicals and cholesterol hyperoxides in blood taken from the coronary sinus of man during percutaneous transluminal coronary angioplasty, *Free rad res comm* **14** : 409-417.
- Colagar, A.H., Marzony, E.T., Chaichi, M.J. (2009)** Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr Res* **29** : 82–8.
- Coleman, JE. (1992).** Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem* **61** : 897–946.
- Collins, J.A, Barnhart, K.T., Schlegel, P.N. (2008)** Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization?. *Fertil Steril* **89** : 823–831.
- Danikowski, S., Sallmann, H.P., Halle, I., Flachowsky, C. (2002)** Influence of high levels of vitamin E on semen parameters of cocks. *J Anim Physiol Anim Nutr(Berl)* **86** : 376-82.
- DeAlmeida, M. (2003).** Anticorps anti-spermatozoïdes : techniques de dépistage et interprétation des résultats. *Andrologie* **13**:63-9.
- De Iuliis, G.N., Newey, R.J., King, B.V., Aitken, R.J. (2009)** Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PLoS One*; **4**:1-9.

- De Lamirande, E and Gagnon, C. (1992)** Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* **13**:368-378.
- De Lamirande, E and Gagnon C, (1995)** Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med* **18**: 487–495.
- De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C. (1997)** Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* **2**:48–54.
- De Lamirande, E and O’Flaherty, C, (2008)** Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et BiophysicaActa—Proteins and Proteomics* **1784** : 106–115.
- Delattre, J., Beaudoux, J.L., Bonnefont-Rousselot, D. (2005)** Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Première édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp 547.
- Demple, B and Levin, J. (1991)** Repair systems for radical damaged DNA, in OXidative stress. Sies H. ed 1991 : 119-154.
- De Rosa, M., Boggia, B., Amalfi, B., Zarrilli, S., Vita, A., Colao, A., Lombardi, G. (2005)** Correlation between seminal carnitine and functional spermatozoal characteristics in men with semen dysfunction of various origins. *Drugs R D* **6** : 1-9.
- Desaint, S., Luriau, S., Aude, J.C., Rousselet, G., Toledano, M.B. (2004)** Mammalian antioxidant defenses are not inducible by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem* **279** : 31157-63.
- De Vries, J.W., Repping, S., van Daalen, S.K., Korver, C.M., Leschot, N.J., van der Veen, F. (2002)** Clinical relevance of partial AZFc deletions. *Fertil Steril* **78** :1209-14.
- Diaconu, M.Y., Tangat, Y., Böhm, D., Kühn, H., Michelmann, H.W., Schreiber,., Et al. (2006)** Failure of phospholipidhydroperoxide glutathione peroxidase expression in oligoasthenozoospermia and mutations in the PHGPx gene. *Andrologia* **38** : 152–157.
- Dieterich, K., Soto Rifo, R., Faure, A.K., Hennebicq, S., Ben Amar, B., Zahi, M., et al. (2007)** Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* **39** : 661-665.
- Drevet, J.R. (2006)** The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol* **250**:70–9.
- Durackova, Z. (2010)** Some current insights into oxidative stress. *Physiol. Res* **59**: 459– 469.

- Eggert-Kruse, W., Kiefer, I., Beck, C., Demirakca, T., Strowitzki, T. (2007)** Role for tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 1-beta (IL-1beta) determination in seminal plasma during infertility investigation. *Fertil Steril* **87**:810–23.
- El-Tohamy, M.M. (2012)** The mechanisms by which oxidative stress and free radical damage produces male infertility. *Life Science Journal* **9**:674–88.
- El Awady, M.K., El Shater, S.F., Ragaa, E., Atef, K., Shaheen, I.M., Megiud, N.A. (2004)** Molecular study on Y chromosome microdeletions in Egyptian males with idiopathic infertility. *Asian J Androl* **6**:53–57.
- Eskenazi, B., Kidd, S.A., Mark, A.R., Slotter, E., Block, G., Wyrobeck, A.J. (2005)** Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy man. *Hum Reprod* **20**:1006-12.
- Evenson, D.P., Jost, L.K, Marshall, D., Zinaman, M.J, Clegg, E., Purvis, K., de Angelis, P., Claussen, O.P. (1999)** Utility of sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in human fertility clinic. *Hum Reprod* **14** :1039–1049.
- Fahmida, K., Ibrahim, H.A., Hafeezullah, W.A., Abdelnaser, B. (2014)** Association of BMI with follicular stimulating hormone and with semen parameters in males. *IOSR Journal of nursing and health science* **3** : 13-23.
- Fattman, C.L., Schaefer, L.M., Oury, T.D. (2003)** Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* **35**: 236-256.
- Faure, C., Dupont, C., Sermondade, N., Lévy, R. (2011)** Antioxydants et infertilité masculine. *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* **13** : 275-283.
- Faure, C., Leveille, P., Dupont, C., Julia, C., Chavatte-Palmer, P; Alifert Group., Sutton, A., Levy, R. (2014)** Are superoxide dismutase2 and nitric oxide synthase polymorphisms associated with idiopathic infertility? *Antioxidants and Redox Signaling* **21** : 565–569.
- Favier, A., Cadet, J., Kalaryanaman, R., Fontecave, M., Pierre, J. (1995)** Analysis of free radicals in biological systems. *Birkhauser New york*.
- Favier, A. (1997)** Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur, *Ann Biol Clin* **55**: 9-16.
- Ferlin, A., Zuccarello, D., Garolla, A., Selice, R., Foresta, C. (2007)** Hormonal and genetic control of testicular descent. *Reprod Biomed Online* **15**: 659-65.
- Fernández, J.L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., et al. (2005)** Halosperm® is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* **84**: 860.

- Ferreira, A., Matsubara, L.S., (1997)** Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress (Portuguese). *Rev Assoc Med Bras* **43** : 61–68.
- Fizazi, A., Bendahmane, M., Elhaina, F. Z. (2015)** Etiology and Toxic Factors Involved in Male Infertility in Western Algeria. *South Asian Journal of Experimental Biology* **5**.
- Fode, M., Krogh-Jespersen, S., Brackett, N.L, Ohl, D.A, Lynne, C.M, Sonksen, J. (2012)** Male sexual dysfunction and infertility associated with neurological disorders. *Asian J Androl* **14** : 61-68.
- Foresta, C., Moro, E., Ferlin, A. (2001)** Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocrine Rev* **22**: 226-39.
- Forsberg, L., Lyrenäs, L., Morgenstern, R., de Faire, U. (2001)** A common functional CT substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radic Biol Med* **30**: 500–505.
- Fraczek, M and Kurpisz M. (2005)** The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy Hig Med Dosw (online)* **59**: 523–534.
- Fraker, P.J., King, L.E., Laakko, T., Vollmer, T.L. (2000)** The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J Nutr* **30** :1399S–1406S.
- Fukai, T and Ushio-Fukai, M. (2011)** Superoxide dismutases: role in redox signaling vascular function and diseases. *Antioxidants & redox signaling* **15**: 1583–1606.
- Gagnon, C., Iwasaki, A., De Lamirande, E., Kovalski, N. (1991)** Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci* **637**: 436–444.
- Gaillard, D.A., Carré-Pigeon, F., Lallemand, A. (1997)** Normal vas deferens in fetuses with cystic fibrosis. *JUrol*; **158**:1549-52.
- Garolla, A., Maiorino, M., Roverato, A., Roveri, A., Ursini, F., Foresta, C. (2005)** Oral carnitine supplementation increases sperm motility in asthenozoospermic men with normal sperm phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase levels. *Fertil Steril* **83** : 355-61.
- Garrido, N., Meseguer, M., Alvarez, J., Sim´on, C., Pellicer, A., Remohi, J. (2004)** “Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertility and Sterility* **82** : 1059–1066.
- Gharagozloo, P and Aitken R.J., (2011)** The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* **26**:1628-1640.

- Giannattasio, A., De Rosa, M., Smeraglia, R., Zarrilli, S., Cimmino A., Di Rosario B., et al., (2002)** Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. *J Endocrinol Invest* **25**:983–6.
- Gibbons, N.C., Wood, J.M., Rokos, H., Schallreuter, K.U. (2006)** Computer simulation of native epidermal enzyme structures in the presence and absence of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): potential and pitfalls. *J Invest Dermatol* **126**: 2576–2582.
- Giuliano, F and Droupy S. (2013)** Dysfonction érectile. *Progrès en urologie* **23** : 629-637.
- Gottfredsen, R.H., Goldstrohm, D.A., Hartney, J.M., Larsen Ulrike, G.R., Bowlerussell P., Petersen S.V. (2014)** The cellular distribution of extracellular superoxide dismutase in macrophages is altered by cellular activation but unaffected by the naturally occurring R213G substitution. *Free radical Bio Mede* **69** : 348-356.
- González-Marín, C., Gosálvez, J., Roy, R. (2012)** Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci* **13**:14026-14052.
- Greco, E., Lacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., Tesarik J. (2005)** Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* **26**:349-53.
- Griswold, M.D. (2016)** Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev* **96**:1-17.
- Griveau, J.F and Le Lannou, D., (1995)** Radicaux libres et spermatozoïdes humains : physiologie et physiopathologie. *Andrologie* **5** : 369-381.
- Hadwana, M.H and Hussein, N.A.B. (2016)** Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data inBrief* **6** :194–199.
- Haiba, F., Kerboua, K., Ait Hami, N., Benmahdi, L. (2014)** Stress oxydatif et infertilité masculine : premiers résultats de l'expérience Algérienne pilote à L' HMRUO/2<sup>o</sup>RM. *Revue Médicale de l'HMRUO*, N°1.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier C., Chapelle, J.P. (2007)** Oxidative stress. *Rev Med Liege* **62** :628-638.
- Hall, L., Williams, K., Perry, A.C., Frayne, J., Jurry, J.A. (1998)** The majority of human glutathione peroxidase type 5(GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem J* **333**:5-9.
- Hammadeh, M.E., Al Hasani, S., Rosenbaum, P., Schmidt, W., Fischer, Hammadeh, C. (2008)** Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF. *Arch GynecolObstet* **277**: 515–526.

- Hammami, W., Kilani, O., Ben Khelifa, M., Ayed, W., Abdelhak, S., Bouzouita, A., Zhioua, F., et al. (2014)** Prevalence Of Y Chromosome Microdeletions In Infertile Tunisian Men». *Ann Biol Clin* **72** : 331-336.
- Harbuz, R., Zouari, R., Pierre, V., Ben Khelifa, M., Kharouf, M., Coutton, C., et al. (2011)** A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet* **88** 351-361.
- Hesham, N., Moemen, L.A., Abu Elela, M.H. (2008)** Studying the levels of malondialdehyde and antioxidant parameters in normal and abnormal human seminal plasma. *Aust J Basic Appl Sci* **2**: 773-778.
- Henkel, R.R and Schill, W.B. (1998)** Sperm separation in patients with urogenital infections. *Andrologia* **30** :91–97.
- Henkel, R.R. (2011)** Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian Journal of Andrology* **13** : 43–52.
- Henkel, R., Maab, G., Jung, A., Haidl, G., Schill, W.B., Schuppe, H.C. (2007)** Age-related changes in seminal polymorphonuclear elastase in men with asymptomatic inflammation of the genital tract. *Asian J Androl* **9**:299–304.
- Hildebrand, M.S., Avenarius, M.R., Fellous, M., Zhang, Y., Meyer, N.C., Auer, J., et al. (2010)** Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet* **18** 1178-1184.
- Ho, Y., Magnenat, J., Bronson, R.T., et al. (1997)** Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *Journal of Biological Chemistry* **272** : 16644–16651.
- Hsieh, Y.Y, Chang, C.C and Lin C.S. (2006)** Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int J Biol Sci* **2**: 23-29.
- Huyghe, E., Matsuda, T., Thonneau, P. (2003)** Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol* **170**: 5-11.
- Huyghe, E. and Thonneau, P-F. (2006)** Fertilité et cancer du testicule IN :Alain Houlgatte (eds). Cancer du testicule. Monographie en urologie. 194 p.
- Ikeda, M., Kodama, H., Fukuda J., Shimizu Y., Murata, M., Kumagai, J., et al. (1999)** Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol. Reprod* **61**:393-399.

- Imade, G.E., Towobola, O.A., Otubu, J.A.M., Sagay, A.S. (1993)** Medico-social factors associated with male infertility. *Andrology in the Nineties* **4**: 21-24.
- Imai, H. and Nakagawa, Y. (2003)** Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* **34**:145–169.
- Imai, H., Hakkaku, N., Iwamoto, R., et al. (2009)** Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice. *Journal of Biological Chemistry* **284** : 32522– 32532.
- Ishii, T., Matsuki, S., Iuchi, Y., Okada, F., Toyosaki, S., Tomita, Y., et al. (2005)** Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radical Research* **39** : 697–705.
- Jarow, J.P. (1994)** Role of ultrasonography in the evaluation of the infertile male. *SeminUrol* **12**:274-82.
- Jarow, J.P. (2003)** Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *J Urol* **170**:675-6.
- Jefferys, A., Siassakos, D., Wardle, P. (2012)** The management of retrograde ejaculation ; a systematic review and update. *Fertil Steril* **97** : 306-312.
- Jeulin, C., Soufir, J.C., Weber, P., Laval-Martin, D., Calvayrac, R. (1989)** Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *GameteRes* **24**: 185-196.
- Jeyendran, R.S. (2003)** Sperm collection and processing methods. *Cambridge University Press* .pp 160.
- Ji, G., Gu, A., Wang, Y., Huang, C., Hu, F., Zhou, Y., et al. (2012a)** Genetic variants in antioxidant genes are associated with sperm DNA damage and risk of male infertility in a Chinese population. *Free Radical Biology and Medicine* **52** : 775–780.
- Ji, M., Tang, J., Zhao, J., Xu, B., Qin, J., Lu, J. (2012b)** Polymorphisms in genes involved in drug detoxification and clinical outcomes of anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in Chinese Han breast cancer patients. *Cancer Boil Ther* **13**: 264–271.
- Jian Pei, P.H. (2005)** Quantitative Evaluation of Spermatozoa Ultrastructure after Acupuncture Treatment for Idiopathic Male Infertility. *Fertility and Sterility* **84** :141-147.
- Jones, R., Mann, T., Sherins, R. (1979)** Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* **31** :531–7.

- Jow, W.W., Schlegel, P.N., Cichon, Z., Phillips, D., Goldstein, M. and Bardin, C.W. (1993)** Identification and localization of copperzincsuperoxide dismutase gene expression in rat testicular development. *Journal of Andrology* **14** : 439–447.
- Kasahara, E., Sato, E.F., Miyoshi, M., Konaka, R., Hiramoto, K., Sasaki, J., et al. (2002)** Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di (2-ethylhexyl) phthalate. *Biochem J* **365**:849-56.
- Kawakami, E., Takemura, A., Sakuma, M., Takano, M., Hirano, T., Hori, T., Tsutsui, T. (2007)** Superoxidedismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic beagles. *Journal of Veterinary Medical Science* **69** : 133–136.
- Kemal, D.N., Morshedi, M., Oehninger, S. (2000).** Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* **74** :1200-7.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N. and Biswal, S. (2007)** Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **47** : 89–116.
- Keskes-Ammar, L., Feki-Chakroun, N., Rebai, T., Sahnoun, Z., Ghozzi, H., Hammami, S., et al. (2003)** Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl* **49**:83–94.
- Khabour, O.F., Fararjeh, A.S. and Alfaouri, A.A. (2014)** Genetic screening for AZF Y chromosome microdeletions in Jordanian azoospermic infertile men. *Int J Mol Epidemiol Genet* **5**:47-50.
- Khodayari, S., Salehi, Z., Fakhrieh Asl, S., Aminian, K., Mirzaei Gisomi, N., Torabi Dalivandan, S. (2013)** Catalase gene C-262T polymorphism: Importance in ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* **28**: 819–822.
- Khosrowbeygi, A., Zarghami, N., Deldar, Y. (2004)** Correlation between sperm quality parameters and seminalplasma antioxidants status. *Int J Reprod BioMed* **2**: 58–64.
- Khosrowbeygi, A. and Zarghami, N. (2007)** Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. *Prostaglandins Leukot, Essent Fatty Acids* **77** :117-21.
- Kim, E.D. (2001)** An overview of male infertility in the era of intracytoplasmic sperm injection. *Chin Med J (Taipei)* **64**:71-83.
- Kim, S.W., Kim, K.D. and Paick, J.S. (1999)** Microdeletions within the azoospermia factor subregions of the Y chromosome in patients with idiopathic azoospermia. *Fertil Steril* **72**:349–353.

- Kiziler, A.R., Aydemir, B., Onaran, I., Alici, B., Ozkara, H., Gulyasar, T., Akyolcu, M.C. (2007)** High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects. *Biol Trace Elem Res* **120**:82-91.
- Kobayashi, T., Miyazaki, T., Natori, M., Nozawa, S. (1991)** Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility : superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Human Reprod* **6** : 987-91.
- Kodydková, J., Vávrová, L., Kocík, M., Zak, A. (2014)** Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol* **60**: 153-167.
- Komina, A.V., Korostileva, K.A., Gyrylova, S.N., Belonogov, R.N., Ruksha, T.G. (2012)** Interaction between single nucleotide polymorphism in catalase gene and catalase activity under the conditions of oxidative stress. *Physiol Res* **61**: 655-658.
- Koşar, P.A., Özçelik, N., Koşar, A. (2010)** Cytogenetic abnormalities detected in patients with non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet.* **27**: 17-21.
- Koscinski, I., Elinati, E., Fossard, C., Redin, C., Muller, J., Velez D.L.C., et al. (2011)** DPY19L2 deletion as a major cause of globozoospermia. *Am JHum Genet* **88** : 344-350.
- Krausz, C., Forti, G. and McElreavey, K. (2003)** The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl* **26**:70–75.
- Krausz, C., Escamilla, A.R. and Chianese, C. (2015)** Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction* **150**:159-174.
- Kumagai, A., Kodama, H., Kumagai, J., Fukuda, J., Kawamura, K., Tanikawa, H., Sato, N., Tanaka, T. (2002)** Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol. Hum. Reprod* **8**: 118-123.
- Larson, K.L., Dejonge, C.J., Barnes, A.M., Jost, L.K., Evenson, D.P. (2000)** Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* **15** :1717–1722.
- Laudat, A., Lecourbe, K. and Palluel, A.M., (1999)** Peroxydation lipidique, profil morphologique de stress testiculaire et maturité nucléaire des spermatozoïdes. *Ann Biol Clin* **57** : 51-6.
- La Vignera, S., Condorelli, R.A., Vicari, E., D’Agata, R., Calogero, A.E. (2012)** Effects of the exposure to mobile phones on male reproduction : a review of the literature. *J Androl* **33**:350-6.
- Lavranos, G., Balla, M., Tzortzopoulou, A., Syriou, V., Angelopoulou, R. (2012)** Investigating ROS sources in male infertility : a common end for numerous pathways. *ReprodToxicol* **34** :298-307.

- Lee, P.A., O'Leary, L.A., Songer, N.J., Coughlin, M.T, Bellinger, M.F., LaPorte, R.E. (1997)** Paternity after bilateral cryptorchidism. A controlled study. *Arch Pediatr Adolesc Med* **151(3)** :260–3.
- Lebret, T. and Cour, F. (2005)** Impuissance : dysfonction érectile. *EMC-Endocrinologie* **2** : 77-89.
- Lemmens, G., Vervaeke, M., Enzlin, P., Bakelants, E., Vanderschueren, D., D'Hooghe, T., et al. (2004)** Coping with Infertility : A Body-Mind Group Intervention Programme for Infertile Couples. *Human Reproduction* **19**:1917-1923.
- Luetjens, C.M., Gromoll, J., Engelhardt, M., Von Eckardstein, S., Bergmann, M., Nieschlag, E., et al. (2002)** Manifestation of Y-chromosomal deletions in the human testis : a morphometrical and immunohistochemical evaluation. *Hum Reprod* **17** :2258-66.
- Lewis-Jones, D.I., Gazvani, M.R. and Mountford, R., (2000)** Cystic fibrosis in infertility : screening before assisted reproduction : opinion. *Hum Reprod* **15** :2415-2417.
- Liu, L., Li, C., Gao, J., Li, K., Zhang, R., Wang, G., et al. (2010)** Promoter variant in the catalase gene is associated with vitiligo in Chinese people. *J Invest Dermatol* **130**: 2647–2653.
- Luddi, A., Margollicci, M., Gambera, L., Serafini, F., Cioni, M., De Leo, V., et al. (2009)** Spermatogenesis in a man with complete deletion of USP9Y. *N Engl J Med* **360** : 881-885.
- Ma, K., Sharkey, A., Kirsch, S., Vogt, P., Keil, R., Hargreave, T.B., et al. (1992)** Towards the molecular localisation of the AZF locus : mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* **1** :29-33.
- Macanovic, B., Vucetic, M., Jankovic, A., Stancic, A., Buzadzic, B., Garalejic, E., Korac, A., Korac, B., Otasevic, V., (2015)** Correlation between sperm parameters and protein expression of antioxidative defense enzymes in seminal plasma: a pilot study. *Disease markers* **2015** :5.
- MacDonald, R.S. (2000)** The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutr* **130** :1500–1508.
- MacLeod, J. (1943)** The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol.* **138** :512–8.
- MacLeod, J. (1965)** Seminal cytology in the presence of varicocele. *Fertil Steril* **16**:735–57.
- Madamanchi, N.R., Vendrov, A., Runge, M.S., (2005)** Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscl Throm Vas* **25** : 29-38.

- Mak, J.C.W., Ho, S.P., Yu, W.C., Choo, K.L., Chu, C.M., Yew, W.W., et al. (2007)** Polymorphisms and functional activity in superoxide dismutase and catalase genes in smokers with COPD. *Eur Respir J* **30** : 684–690.
- Makker, K., Agarwal, A. and Sharma, R. (2009)** Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* **129**: 357-367.
- Malinska, D., Kulawiak, B., Kudin, A.P., Kovacs, R., Huchzermeyer, C., Kann, O. (2010)** Complex III-dependent superoxide production of brain mitochondria contributes to seizure-related ROS formation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1797** : 1163–1170.
- Mennella, M.R.F. and Jones, R. (1980)** Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation and reactions in semen. *Biochemical Journal* **191**: 289–297.
- Marbut, M.M., Dkhel Haussin, H., Hadi Azzawi, M. (2011)** The effect of oxidative stress on semen parameters of normal & infertile men in Tikrit city. *Tikrit Medical Journal* **17**:1-10.
- Marcelli, F., Robin, G. and Rigot, J-M. (2009)** Prise en charge de l'infertilité masculine. *Progrès en urologie* **19** :260-264.
- Maret, W. (2000)** The function of zinc metallothionein : a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr* **130** : 1455–1458.
- Marzec-Wróblewska, U., Kamiński, P., Lakota, P., Szymański, M., Wasilow, K., Ludwikowski, G., et al. (2010)** Zinc and Iron Concentration and SOD Activity in Human Semen and Seminal Plasma. *Biol Trace Elem Res* **143** :167-177.
- Matzuk, M. M. and Lamb, D.J. (2008)** The biology of infertility : research advances and clinical challenges. *Nat Med* **14**: 1197-213.
- Meseguer, M., Mart'inez-Conejero, J.A., Muriel, L., Pellicer, A., Remoh'ı, J. and Garrido N. (2007)** The human sperm glutathione system :a key role in male fertility and successful cryopreservation. *Drug Metabolism Letters* **1** : 121–126.
- Methorst, C., Huyghe, E. et les membres du Comité d'Andrologie et de Médecine Sexuelle de l'Association Française d'Urologie. (2014)** Stress oxydant et infertilité masculine : physiopathologie et intérêt thérapeutique desantioxydants. *Progrès en urologie*. **24** : 4-10.
- Meydani, M. (1995)** Vitamin E. *Lancet* **345** : 170-5.
- Moez, K., Fethi, Z., Amel, Z., Gaied, A.and Merdassi, G. (2015)** Cytogenetic and Y Chromosome Microdeletions Screening in Tunisian Infertile Men. *Donnish Journal of Genetics and Molecular Biology* **1** : 01-05.

- Morales, A and Cavicchia, J.C. (2002)** Spermatogenesis and blood-testis barrier in rats after long-term vitamin A deprivation. *Tissue Cell* **34** : 349-55.
- Mori, M.M., Bertolla, R.P., Fraietta, R., Ortiz, V., Cedenho, A.P. (2008)** Does varicocele grade determine extent of alteration to spermatogenesis in adolescents. *Fertil Steril* **90**:1769-73.
- Morten, K.J., Ackrell, B.A. and Melov, S. (2006)** Mitochondrial reactive oxygen species in mice lacking superoxide dismutase 2 : attenuation via antioxidant treatment. *J Biol Chem* **281** :3354–9.
- Mruk, D. D., Silvestrini, B., Mo, M., Cheng, C.Y. (2002)** Antioxidant superoxide dismutase- a review : its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* **65** : 305-311.
- Muratorio, C., Meunier, M., Sonigo, C., Massart, P., Boitrelle, F., Hugues, J.N. (2013)** Varicocèle et infertilité : ou en sommes-nous en 2013 ?. *Gynécologie Obstétrique & infertilité* **41** : 660-666.
- Murawski, M., Jolanta, S., Anna, M., Agnieszka, C., Marian, G., Teresa, B. (2007)** Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* **45** :123-126.
- Murphy, F., Paran, T.S. and Puri, P., (2007)** Orchidopexy and its impact on fertility. *PediatrSurgInt* **23**:625-632.
- Naasse, Y., Charoute, H., El Houate, B., Elbekkay, C., Razoki, L., Malki, A., Barakat, A. and Rouba, H. (2015)** Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men from Morocco. *Urology* **15** :95.
- Nabil, H., Moemen, L.A., Elela, M.H.A. (2008)** Studying the levels of malondialdehyde and antioxidant parameters in normal and abnormal human seminal plasma. *Aust J Basic ApplSci* **2**: 773–8.
- Nadif, R., Mintz, M., Jedlicka, A., Bertrand, J.-P., Kleeberger, S.R., Kauffmann, F. (2005)** Association of CAT polymorphisms with catalase activity and exposure to environmental oxidative stimuli. *Free Radic Res* **39**: 1345–1350.
- Najmabadi, H., Huang, V., Yen, P., Subbarao, M.N., Bhasin, D., Banaag, L., et al. (1996)** Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy. *J Clin Endocrinol Metab* **81**:1347–1352.
- Nakamura, B.N., Lawson, G., Chan, I.Y., Banuelos, J., Cortés, M.M., Hoang, Y.D., et al. (2010)** Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an agedependent manner. *Free Radical Biology and Medicine* **49** : 1368–1379.

- Nallella, K.P., Allamaneni, S.S.R. and Pasqualotto, F.F. (2004)** Relationship of interleukin-6 with semen characteristics and oxidative stress in patients with varicocele. *Urology* **64** :1010–3.
- Nandipati, K.C., Pasqualotto, F.F., Thomas, A. J Jr., Agarwal, A., (2005)** Relationship of interleukin-6 with semen characteristics and oxidative stress in vasectomy reversal patients. *Andrologia* **37**:131-4.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J. and Pickett, C.B. (2003)** Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **43** :233-260.
- Nozik-Grayck, E., Suliman, H.B., Piantadosi, C.A. (2005)** Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 2466-2471.
- O’Flaherty, A.C. (2014a)** Peroxiredoxins, hidden players in the antioxidant defence of human spermatozoa. *Basic and Clinical Andrology* **24** : 4.
- O’Flaherty Cristian, (2014b).** The Enzymatic Antioxidant System of Human Spermatozoa. *Advances in Andrology* **2014** : 15.
- Oliva, R. (2006)** Protamines and male infertility. *Hum reprod update* **12**: 417–435.
- Ookawara, T., Kizaki, T., Takayama, E., Imazeki, N., Matsubara, O., Ikeda, Y., et al. (2002)** Nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **296** : 54-61.
- Organisation Mondiale de la Santé, OMS. (1992)** The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil Steril* **57**:1289–1293.
- Organisation Mondiale de la Santé, OMS. (2010)** WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed.
- Osterlund, C., Sergersteen, E., Aver, S., Pousette, A. (2000)** Low number of Y chromosome deletions in infertile azoospermic men at a Swedish Andrology Centre. *Int J Androl* **23** : 225-9.
- Ounis, (2014)** Les anomalies morphologiques responsables des infertilités masculines dans l’Est Algérien : Aspect épidémiologique et génétique. Thèse de doctorat : Biologie et Santé. Université Constantine 1.
- Palmero, S., Bottazzi, C., Costa, M., Leone, M., Fugassa, E. (2000)** Metabolic effects of L-carnitine on prepubertal rat Sertoli cells. *Horm Metab Res* **32** : 87-90.

- Pant, N., Shukla, M., Kumar, Patel D., Shukla Y., Mathur N., Kumar Gupta Y., et al. (2008).** Correlation of phthalate exposures with semen quality. *Toxicol Appl Pharmacol* **231**:112-6.
- Pellati, D., Mylonakis, I., Bertoloni, G., Fiore, C., Andrisani, A., Ambrosini, G., et al. (2008)** Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **140** :3–11.
- Perianayagam, M.C., Liangos, O., Kolyada, A.Y., Wald, R., MacKinnon, R.W., Li, L., et al. (2007)** NADPH oxidase p22phox and catalase gene variants are associated with biomarkers of oxidative stress and adverse outcomes in acute renal failure. *J Am SocNephrol* **18**: 255–263.
- Peter, F Surai. (2015)** Antioxidant Systems in Poultry Biology: Superoxide Dismutase. *iMedPub Journals* **1** :17.
- Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm GW., et al. (2001)** Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protaminethiol cross-linking during sperm maturation. *The FASEB Journal* **15** : 1236–1238.
- Pietri, S., Seguin, J., D’arbigny, P., Ulcasi, M. (1994)** Ascorbyl free radical : a non invasive marker of oxidative stress in human open-heart surgery. *Free rad biol Med* **16** : 523 – 528.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., and JO, D. (1999)** Méthodes d’évaluation du stress oxydatif chez l’homme : importance en matière de prévention. *Cancérologie Medi Sphere* **95** : 4.
- Plante, M., de Lamirande, E. and Gagnon, C. (1994)** Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril* **62** : 387–93.
- Plotton, I., Giscard d'Estaing, S., Cuzin, B., Brosse, A., Benchaib, M., Lornage, J. et al. (2015)** Preliminary results of a prospective study of testicular sperm extraction in young versus adult patients with nonmosaic 47, XXY Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **100**:961–967.
- Poongothai, J., Gopenath, T. S. and Manonayaki, S. (2009)** Genetics of human male infertility. *Singapore MedJ* **50** : 336-47.
- Pons-Rejraji, H., Sion, B., Saez, F., Brugnon, F., Janny, L., Grizard, G. (2009)** Rôles des dérivés actifs de l’oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* **37** : 529–535.
- Pushpa-Rekha, T.R., Burdsall, A.L., Oleksa, L.M., Chisolm, G.M. and Driscoll, D.M. (1995)** Rat phospholipid-hydroperoxideglutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *The Journal of Biological Chemistry* **270** : 26993–26999.

- Ramya, T., Misro, M.M., Sinha, D., Nandan, D., Mithal, S. (2011)** Altered levels of seminal nitric oxide, nitric oxide synthase, and enzymatic antioxidants and their association with sperm function in infertile subjects. *Fertil Steril* **95**: 15–140.
- Rao, B., Souflir, C., Martin, M.& David, G. (1989)** Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res* **24** : 127-134.
- Ravel, C., McElreavey, K., Mandelbaum, J., Siffroi, J.P. (2007)** polymorphismes génétiques et infertilité masculine. *Mt medecine de la reproduction* **9** : 219-29.
- Rejeb, I., M'rad, R., Maazoul, F., Trabelsi, M., Ben Jemaa, L., Chaabouni, M., et al. (2008)** Y chromosome microdeletions in Tunisian infertile males. *Pathol Biol* **56** :111-115.
- Rengan, A.K., Agarwal, A., Van der Linde, M., Du Plessis, S.S. (2012)** An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reprod Biol Endocrinol* **10**:92.
- Richard, M.J., Portal, B., Meo, J., Coudray, C., Hadjian, A., Favier, A. (1992)** Malonaldehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem* **38** : 704-709.
- Rowe, P.J., Comhaire, F.H., Hargreave, T.B., Mahmoud, A.M. (2000)** WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge University Press Geneva : 91.
- Roy, S., Banerjee, A., Pandey, H.C., Singh, G., Kumari, G.L., (2001)** Application of seminal germ cell morphology and semen biochemistry in the diagnosis and management of azoospermic subjects. *Asian J Androl* **3** : 55-62.
- Ruiz-Sanz, J.I., Aurrekoetxea, I., Matorras, R.and Ruiz-Larrea, M.B. (2011)** Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in in vitro fertilization cycles. *Fertilityand Sterility* **95** : 1601-1605.
- Sabouhi, S.,Salehi, Z.,Bahadori, M.H. and Mahdavi, M. (2015)** Humancatalase gene polymorphism (CAT C-262T) and risk of male infertility. *Andrologia* **47** : 97–101.
- Said, M., Al-Dalaen., Aiman I Al-Qtaitat. (2014)** Oxidative Stress Versus Antioxidants. *American Journal of Bioscience and Bioengineering* **2** : 60-71.
- Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P.G. and Bianchi, U. (1999)** Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* **4** : 31–37.

- Saleh, R.A., Agarwal, A., Sharma, R.K., Nelson, D.R., Thomas, A.J Jr. (2002a)** Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men : a prospective study. *Fertil Steril* **78**:491-9.
- Salenave, S., Trabado, S., Maione, L., Brailly-Tabard, S., Young, J. (2012)** Male acquired hypogonadotropic hypogonadism: diagnosis and treatment. *Ann Endocrinol* **73**:141-146.
- Saleh, R.A., Agarwal, A., Nada, E.A., El-Tonsy, M.H., Sharma, R.K., Meyer, A., et al. (2003)** Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* **79**:1597-1605.
- Samant Parineeta, M., BadadeZunjarrao, G., Kate Madhuri, S., Deepak, A.D. (2009)** Seminal Malondialdehyde Concentration and Superoxide Dismutase, CAT Activity In Male Infertility. *Internet J Health* **11**: 1-7.
- Sanocka, D., Miesel, R., Jedrzejczak, P., Chelmonska-Soyta, A.C., Kurpisz, M. (1997)** Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen ; association with male infertility. *Int J Androl* **20**: 255-264.
- Sanocka-Maciejewska, D., Ciupinska, M. and Kurpisz, M. (2005)** Bacterial infection and semen quality. *J Reprod Immunol* **67**:51–6.
- Sara, E.E., Hongfei, G., Neal, F., Amy, D., Linda, P. F., Qian-Li Xue., et al. (2008)** Glutathione Peroxidase Enzyme Activity in Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **63** :505–509.
- Schneider, M., Forster, H., Boersma, A., et al. (2009)** Mitochondrialglutathione peroxidase 4 disruption causesmale infertility.*TheFASEB Journal* **23** : 3233–3242.
- Sepaniak, S., Forges, T., Fontaine, B., Gerard, H., Foliguet, B., Guillet-May., t al. (2004)** Impact négatif du tabac sur la fertilité masculine : des spermatozoïdes à la descendance. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* **33** :384-390.
- Setchell, B.P. (1998)** The Parkes Lecture : heat and the testis. *J Reprod Fertil* **114** :179–94.
- Schlosser, J., Nakib, I., Carré-Pigeon, F., Staerman, F. (2006)** Infertilité masculine : bilan. *Annales d’Urologie* **40** :349-354.
- Schuppe, H.C., Meinhardt, A., Allam, J.P., et al. (2008)** Chronic orchitis : a neglected cause of male infertility ?. *Andrologia* **40**:84–91.
- Schulte, R.T., Ohl, D.A., Sigman, M., Smith, G.D. (2010)** Sperm DNA damage in male infertility : etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet* **27** :3-12.

- Scibior, D., Czczot, H. (2006)** Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw* 60: 170–180.
- Shamsi, M.B., Venkatesh, S., Kumar, R., Gupta, N.P., Malhotra, N., Singh, N., et al. (2010)** Antioxidant levels in blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men. *Indian J Biochem Biophys.* 47:38-43.
- Sharlip, I.D., Jarow, J.P., Belker, A.M., Lipshultz, L.I., Sigman, M., Thomas, A.J., et al. (2002)** Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* 77(5) :873-82.
- Slater, T.F. (198)** Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in enzymology* 105 : 283-293.
- Sigman, M. and Jarow, J.P. (1997)** Endocrine evaluation of infertile men. *Urology* 50:659–64.
- Silber, S.J., Alagappan, R., Brown, L.G., Page, D.C. (1998)** Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 13:3332–3337.
- Simoni, M., Bakker, E. and Krausz, C. (2004)** EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art. *Int J Androl* 27:240–249.
- Simonian, N.A. and Coyle, J.T. (1996)** Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol* 36 : 83-106.
- Sonmez M., Turk G. and Yuce A. (2005).** The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology* 63 : 2063-72.
- Spano, M., Bonde, J.P., Hjollund, H.I., Kolstad, H.A., Cordelli, E. and Leter, G. (2000)** Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 73 : 43–50.
- Suleiman, S.A., Ali, M.E., Zaki, Z.M., El Malik, E.M., Nasr, M.A. (1996)** Lipid peroxidation and human sperm motility : protective role of vitamin E. *J Androl* 17 : 530-7.
- Tandara, M., Bajic, A., Tandara, L., Bilic´-Zulle, L., S´unj, M., Kozina, V., Golu\_za, T. and Juki, M. (2014)** Sperm DNA integrity testing : big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. *Andrology* 2 :678–686.
- Tang, H., Dong, X., Day, R.S., Hassan, M.M., Li, D. (2010)** Antioxidant genes, diabetes and dietary antioxidants in association with risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 31 :607-13.

- Tavilani, H., Doosti, M., and Saeidi, H. (2005).** Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. *Clinica Chimica Acta* **356** :199–203.
- Tavilani, H., Goodarzi, M.T., Vaisi-Raygani, A., Salimi, S., Hassanzadeh, T. (2008)** Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *Int braz j urol* **34**:485-91.
- Taylor, R.W. and Turnbull, D.M. (2005)** Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* **6** :389-402.
- Tollner, T.L., Bevins, C.L, Cherr, G.N. (2012)** Multifunctional glycoprotein DEFB126--a curious story of defensin-clad spermatozoa. *Nat Rev Urol* **9** : 365-375.
- Trabado, S., Sophie, L., Luigi, M., Claire, B., Julie, S., Sylvie, B.T., et al. (2014)** Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism and Kallmann Syndrome as Models for Studying Hormonal Regulation of Human Testicular Endocrine Functions. *Ann Endocrinol* **75**:79-87.
- Tramer, F., Caponecchia, L., Sgro, P., Martinelli, M., Sandri, G., Panfili, E., Lenzi, A., Gandini, L. (2004)** Native specific activity of glutathione peroxidase (GPx-1), phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) and glutathione reductase (GR) does not differ between normo- and hypomotile human sperm samples. *Int J Androl* **27**:88-93.
- Tremellen Kelton, (2008)** Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum Reprod Update* **14** : 243–258.
- Trsinar, B. and Muravec, U.R. (2009)** Fertility potential after unilateral and bilateral orchidopexy for cryptorchidism. *World J Urol* **27** : 513–519.
- Trussell, J.C. (2013)** Optimal diagnosis and medical treatment of male infertility. *Semin Reprod Med* **31**:235-236.
- Tsai, W.W., Niessen, S., Goebel, N., Yates, J.R., Guccione, E., Montminy, M, (2013)** PRMT5 modulates the metabolic response to fasting signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** :8870-8875.
- Tsujimura, A., Matsumiya, K., Miyagawa, Y., Takao, T., Fujita, K., Koga, M., et al. (2004)** Prediction of successful outcome of microdissection testicular sperm extraction in men with idiopathic nonobstructive azoospermia. *J Urol.* **172** :1944–1947.
- Turchi, P. (2015).**Prevalence, Definition, and Classification of Infertility. **In : Cavallini G., Beretta G. (eds).** Clinical Management of Male Infertility. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London : 180.

- Tvrda, E., Zuzana, K., László, B., Péter, M., Norbert, L. (2011)** Impact of oxidative stress on male fertility –a review. *Acta Veterinaria Hungarica* **59** :465–484.
- Umopathy, E., Simbini, T., Chipata, T., et al. (2001)** Sperm characteristics and accessory sex gland functions in HIV-infected men. *Arch Androl* **46** :153–8.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., et al. (1999)** Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* vol. **285** :1393–1396.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., et al. (2007)** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 44-84.
- Vernet, P., Aitken, R.J. and Drevet, J.R. (2004)** Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol* **216**:31-9.
- Vicari, E., La Vignera, S., Calogero, A.E. (2002)** Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatovesiculoepididymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds. *Fertil Steril* **78** : 1203-8.
- Vinita, T. (2013)** Role of Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase in Infertility. *Medical Science* **2**: 353-354.
- Vogt, P.H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., et al. (1996)** Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* **5** :933-43.
- Von Eckardstein, S., Simoni, M., Bergmann, M., Weinbauer, G.F., Gassner, P., Schepers, A.G., et al. (1999)** Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab* **84**:2496–501.
- Walczak-Jedrzejowska, R., Wolski, J.K., Slowikowska-Hilczer, J. (2013)** The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent European J Urol* **66**:60–67.
- Wang, R.X., Fu, C., Yang, Y.P, Han, R.R, Dong, Y., Dai, R.L., Liu, R.Z. (2010)** Male infertility in China: laboratory finding for AZF microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile men from Northeastern China. *J Assist Reprod Genet.* **27**: 391-396.
- Ward, W.S. and Coffey, D.S. (1991)** DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa : comparison with somatic cells. *Biol Reprod* **44** : 569–574.

- Weidner, W., Colpi, G.M., Hargreave, T.B., et al. (2002)** EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol* **42**:313–22.
- Wijeratna, S., Seneviratnel, H.R., Ratnasooriya, W.D. (2005)** Reproductive hormones in seminal plasma, its effect on semen quality. *The Ceylon Journal of medical science* **48** :53-60.
- Williams, A.C and Ford, W.C.L. (2004)** Functional significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm. *Biology of Reproduction* **71** : 1309–1316.
- Williams, A.C. and Ford, W.C. (2005)** Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. *Fertil. Steril* **4** : 929-936.
- Will, M.A., Swain, J., Fode, M., Sonksen, J., Christman, G.M., Ohl, D. (2011)** The great debate : varicocele treatment and impact on fertility. *Fertil Steril* **95**:841-52.
- Winters, B.R. and Walsh, T.J. (2014)** The epidemiology of male infertility. *Urol Clin North Am* **41**:195–204.
- Wu, F.Y.-H., Wu, C.-W. (1987)** Zinc in DNA replication and transcription. *Ann Rev Nutr* **7** : 251–272.
- Yan, L., Liu, J., Wu, S., Zhang, S., Ji, G. and Gu, A. (2014)** Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **31** : 549–554.
- Yeung, C.H., Cooper, T.G., De Geyter, M., De Geyter, C., Rolf, C., Kamischke, A., Nieschlag, E. (1998)** Studies on the origin of redox enzymes in seminal plasma and their relationship with results of in-vitro fertilization. *Mol Hum Reprod* **4**: 835–839.
- Young, J. (2016)** Infertilité masculine: mécanismes, causes et exploration. *Atelier MCED* **80** : 29-36.
- YU, B. and Huang, Z. (2015)** Variations in Antioxidant Genes and Male Infertility. *BioMed Research International* **2015** : 1-10.
- Zago, M.P., Oteiza, P.I. (2001)** The antioxidant properties of zinc : interactions with iron and antioxidants. *Free Radic Biol Med* **31** : 266-274.
- Zarbock, R., Hendig, D., Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C. (2007)** Pseudoxanthoma elasticum: genetic variations in antioxidant genes are risk factors for early disease onset. *ClinChem* **53**: 1734–1740.

**Zelen, I., Mitrović, M., Aleksandra, Jurišić-Škevin2 Isa, (2010)** Activity of superoxide dismutase and catalase and content of malondialdehyde in seminal plasma of infertile patients. *Med pregl lxiii* **63**: 624-629.

**Zhou, X., Liu, F., Zhai, S. (2007)** Effect of L-carnitine and/or L-acetylcarnitine in nutrition treatment for male infertility : a systematic review. *Asia Pac J Clin Nutr* **2** : 383-90.

**Zini, A., Lamirande, E. and Gagnon, C. (1993)** Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase-and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International journal of andrology* **16**: 183–188.

**Zini, A., Garrels, K. and Phang, D. (2000)** Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology* **55** : 922–926.

**Zini, A. and Elhathal, N. (2011)** Antioxidant Therapy In Male Infertility : Fact Or Fiction ? *Asian Journal Of Andrology* **13** : 374-381.

**Zorn, J.R. (2006)** Place actuelle du test de Hühner dans l'exploration de la stérilité conjugale. *Gynecol Obstet Fertil* **34**:142-6.

# *Annexes*

**Annexe 1 : Consentement****Consentement à l'utilisation du sperme et du sang pour des études biologiques**

Je soussigne Monsieur, .....

Avoir été informé par écrit que mes prélèvements (sperme et sang) seront utilisés pour des études biologiques. J'ai été informé aussi qu'à la fin des études mes prélèvements ne seront pas stockés et seront détruits.

**Signature du concerné**

**Annexe 2 : Interrogatoire****Fiche des renseignements**

N° de la fiche :

Nom. Prénom :

Date de naissance :

Profession :

Numéro de téléphone :

Milieu de Vie / région d'origine :

Taille :

Poids :

Durée du désir de grossesse :

**Statut matrimonial**

Marié : oui/\_\_\_/ non /\_\_\_/depuis Quand ?

Polygame /\_\_\_/ Monogame /\_\_\_/

Nombres d'enfants : avec sa (ses) femme(s)..... Avec autres femmes.....

Célibataire /\_\_\_/ Divorcé /\_\_\_/ Veuf /\_\_\_/

**Antécédents**

1. Antécédents de la fratrie :

2. Antécédents de pathologie testiculaire :

Cryptorchidie /\_\_\_/ traumatisme testiculaire /\_\_\_/

3. Antécédents chirurgicaux :

Chirurgie pelvienne /\_\_\_/ Chirurgie inguinale/\_\_\_/

Chirurgie scrotale /\_\_\_/Chirurgie testiculaire /\_\_\_/

4. Antécédents médicaux :

Maladies sexuellement transmissibles /\_\_\_/ tuberculose /\_\_\_/ bronchites/\_\_\_/ orchite

ourlienne /\_\_\_/ Prostatite /\_\_\_/Diabète /\_\_\_/ Varicocèle /\_\_\_/ hypertension /\_\_\_

/Drépanocytose /\_\_\_/ Tumeur /\_\_\_/Kyste /\_\_\_/

## 5. Autres antécédents :

\*Exposition professionnelle : chaleur /\_\_ / solvants organiques /\_\_ / pesticides /\_\_ /

\*Addictions: alcool /\_\_ / tabac /\_\_ / cannabis /\_\_ / héroïne /\_\_ /  
Sport de compétition /\_\_ /

\*Traitements passés ou en cours : passés /\_\_ / en cours /\_\_ /

Chimiothérapie /\_\_ / radiothérapie /\_\_ / depuis quand ?.....

**Symptomatologies**

Troubles rénaux ou urinaires :

Polyurie /\_\_ / Oligurie /\_\_ / Anurie /\_\_ /  
Pollakiurie /\_\_ / Dysurie /\_\_ / Incontinence d'urine /\_\_ /  
Rétention aigue d'urine /\_\_ / Enurésie /\_\_ /  
Hématurie /\_\_ / Pyurie /\_\_ /

Trouble de l'éjaculation :

Ejaculation Préaturé /\_\_ / An éjacula /\_\_ /  
Ejaculation rétrograde /\_\_ / hémospemie /\_\_ /  
Trouble de L'érection /\_\_ / Trouble de la libido /\_\_ /

**Renseignements sur le couple :**

Age de l'épouse :

Etat de santé de l'épouse :

La date de vie commune, avec/sans contraception :

Période de l'incapacité de procréer :

Présence de problèmes de fertilité chez la femme : oui /\_\_ / non /\_\_ /

Rapports sexuels réguliers et physiologiques, programmés en préovulatoire

Oui /\_\_ / non /\_\_ /

Leurs fréquences : réguliers /\_\_ / épisodiques /\_\_ /

Prise médicamenteuse par l'homme : oui /\_\_ / non /\_\_ /

Quels médicaments.

Prise médicamenteuse par la femme : oui /\_\_ / non /\_\_ /

Quels médicaments.

## Annexe 3 : Manuel du dosage du SOD

 $\alpha\beta\chi$ 

**RANSOD**  
Superoxide dismutase  
MANUAL  
RX MONZA

**INTENDED USE**

For the quantitative *in vitro* determination of Superoxide dismutase in whole blood. This product is suitable for manual use and on the Rx Monza.

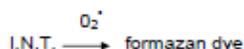
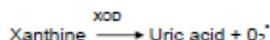
**Cat. No.**

SD 125	R1a. Mixed Substrate	5 x 20 ml
5 x 20 ml	R1b. Buffer	1 x 105 ml
	R2. Xanthine Oxidase	3 x 10 ml
	CAL Standard	5 x 10 ml

**ASSAY PRINCIPLE**

The role of superoxide dismutase (SOD) is to accelerate the dismutation of the toxic superoxide radical ( $O_2^{\cdot -}$ ), produced during oxidative energy processes, to hydrogen peroxide and molecular oxygen.

This method employs xanthine and xanthine oxidase (XOD) to generate superoxide radicals which react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) to form a red formazan dye. The superoxide dismutase activity is then measured by the degree of inhibition of this reaction. One unit of SOD is that which causes a 50% inhibition of the rate of reduction of INT under the conditions of the assay.



OR

**SAMPLE PREPARATION**

Use heparinized or EDTA whole blood samples. It is recommended that erythrocytes should be washed four times with 0.9% NaCl solution.

Centrifuge 0.5 ml of whole blood for 10 minutes at 3000 rpm and then aspirate off the plasma. Then wash erythrocytes four times with 3 ml of 0.9% NaCl solution centrifuging for 10 minutes at 3000 rpm after each wash.

The washed centrifuged erythrocytes should then be made up to 2.0 ml with cold redistilled water, mixed and left to stand at +4°C for 15 minutes. The lysate is diluted with 0.01 mol/l Phosphate Buffer pH 7.0, so that the % inhibition falls between 30% and 80%.

A 25 fold dilution of lysate is recommended for human samples (Final dilution factor = 100) and a 50 fold dilution for bovine samples (Final dilution factor = 200).

**REAGENT COMPOSITION**

Contents	Initial Concentration of Solutions
<b>R1a. Mixed Substrate</b>	
Xanthine	0.05 mmol/l
I.N.T.	0.025 mmol/l
<b>R1b. Buffer</b>	
CAPS	40 mmol/l, pH 10.2
EDTA	0.94 mmol/l
<b>R2. Xanthine Oxidase</b>	80 U/l
<b>CAL Standard</b>	See assigned value on Lot Specific Insert

**SAFETY PRECAUTIONS AND WARNINGS**

For *in vitro* diagnostic use only. Do not pipette by mouth. Exercise the normal precautions required for handling laboratory reagents.

Health and Safety data sheets are available on request.

**The reagents must be used only for the purpose intended by suitably qualified laboratory personnel, under appropriate laboratory conditions.**

**STABILITY AND PREPARATION OF REAGENTS****R1a. Mixed Substrate**

Reconstitute the contents of one vial of Mixed Substrate R1a with 20 ml of Buffer R1b. Stable for 10 days when stored at +2 to +8°C.

**R1b. Buffer**

Contents ready for use. Stable up to the expiry date when stored at +2 to +8°C.

**R2. Xanthine Oxidase**

Reconstitute one vial of Xanthine Oxidase R2 with 10 ml of redistilled water. Stable for 2 weeks when stored at +2 to +8°C.

**CAL Standards**

Reconstitute one vial of Standard (CAL) with 10 ml of redistilled water. Subsequent dilutions of this standard should be prepared with Ransod sample diluent.

R1 = Mixed Substrate

R2 = Xanthine Oxidase

**It is recommended that all reagents and samples are equilibrated to room temperature prior to use.**

**MATERIALS PROVIDED**

Mixed Substrate  
Buffer  
Xanthine Oxidase  
Standard

**MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

Ransod Diluent (Cat. No. SD 124) (0.01 mol/l Phosphate Buffer, pH 7.0)  
Ransod Control (Cat. No. SD 126)

**PROCEDURE**

Select SOD in the Run Test screen and carry out a water blank as instructed.

Pipette into a cuvette:

	Standard S1	Standards S2 TO S6	Samples	Control
Ransod Sample Diluent	30 µl	-	-	-
Standard	-	30 µl	-	-
Diluted Sample	-	-	30 µl	-
Diluted Control	-	-	-	30 µl
Mixed substrate (R1)	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Mix well and add :-

	Xanthine Oxidase (R2)	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl

Mix well, insert the cuvette into the Rx Monza cell holder and press read.

**CALIBRATION**

Calibrate this assay using the standard supplied with the kit. It is recommended that the following dilutions are made of the Standard CAL (or S6) to produce a standard curve:-

Standard	Volume of Standard Soln	Sample Diluent
S6	Undiluted Standard	-
S5	5 ml of S6	5 ml
S4	5 ml of S5	5 ml
S3	5 ml of S4	5 ml
S2	3 ml of S3	6 ml

S1 = Sample Diluent (0.01 mol Phosphate buffer pH 7.0)  
All diluted standards are stable for 2 weeks at +2 to +8°C.  
A fresh calibration is required for each run.

**FOR MANUAL USE**

Wavelength:	505 nm
Cuvette:	1 cm path length
Temperature:	37°C
Measurement:	against air

Pipette sample and R1 into a cuvette and mix well. Add R2, mix and read initial absorbance  $A_1$  after 30 seconds and start timer simultaneously read final absorbance  $A_2$  after 3 minutes.

**CALCULATION**

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = -A/\text{min of standard or sample}$$

Sample diluent rate (S1 rate) = rate of uninhibited reaction = 100 %

All standard rates and diluted sample rates must be converted into percentages of the sample diluent rate, and subtracted from 100 % to give a percentage inhibition.

$$100 - \frac{(-A_{\text{std/min}} \times 100)}{(-A_{\text{S1/min}})} = \% \text{ inhibition}$$

$$100 - \frac{(-A_{\text{sample/min}} \times 100)}{(-A_{\text{S1/min}})} = \% \text{ inhibition}$$

Plot percentage inhibition for each standard against  $\text{Log}_{10}$  (standard conc. in SOD units/ml)

Use percentage inhibition of sample to obtain units of SOD from standard curve.

SOD units/ml of whole blood =

SOD units/ml from std curve x dilution factor

**Converting to SOD units/g Haemoglobin**

$$\frac{\text{SOD units /ml}}{\text{g Haemoglobin/ml}} = \text{SOD units/g Haemoglobin}$$

**ILLUSTRATION**

(a) A bovine sample was diluted 1 in 300 times with Ransod sample diluent. The diluted sample gave an inhibition of 33 %.

From the standard curve:

$$\text{Number of SOD units in sample} = 0.575$$

**(b) Converting to SOD units/ml of whole blood**

$$0.575 \times 300 = 172.5 \text{ SOD units/ml}$$

**(c) Converting to SOD units/g Haemoglobin**

Sample haemoglobin value = 0.118 g/ml

$$(\text{SOD units/ml})/(\text{g Haemoglobin/ml}) = \frac{172.5}{0.118} = 1461.9$$

**QUALITY CONTROL**

Ransod Control is recommended for daily quality control. The control should be assayed at least once a day. Values obtained should fall within a specified range. If these values fall outside the range and repetition excludes error, the following steps should be taken:

1. Check instrument settings and light source.
2. Check cleanliness of all equipment in use.
3. Check water, contaminants i.e. bacterial growth may contribute to inaccurate results.
4. Check reaction temperature.
5. Check expiry date of kit and contents.
6. Contact Randox Laboratories Customer Technical Support, Northern Ireland (028) 94422413.

MANUAL/ RX MONZA - RANSOD - SD 125

PAGE 3 OF 3

**NORMAL RANGES**

1102 - 1601 U/g Hb  
164 - 240 U/ml

It is recommended that each laboratory establish its own reference range to reflect the age, sex, diet and geographical location of the population.

**SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

The following performance data were obtained using an Rx Monza analyser in cuvette mode at 37°C.

**LINEARITY**

Samples should be diluted to give an inhibition between 30 % and 60 % of the sample diluent rate (i.e. the uninhibited reaction).

**SENSITIVITY**

The minimum detectable concentration of SOD less than standards should be reported as <S1 standard value.

**PRECISION****Within run precision**

	Level 1	Level 2
Mean	101.0	131.5
SD	4.88	4.30
CV(%)	4.84	3.58
n	20	20

**Between run precision**

	Level 1	Level 2
Mean	101.0	131.5
SD	6.27	8.50
CV(%)	5.96	7.07
n	20	20

**CORRELATION**

The Randox method on the Rx Monza (Y) was compared to the Rx Daytona (X) and the following linear regression equation was obtained:

$$Y = 0.9417 X + 0.1004$$

and a correlation coefficient of 0.965

41 patient samples were analysed spanning the range 23 - 318U/ml.

**REFERENCES**

1. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH Research in Veterinary Science 1983, **34**: 253-256.
2. Suttle NF, The Veterinary Record 1986, **119**: 519-522.
3. Suttle NF, McMurray CH Research in Veterinary Science 1983; **35**: 47-52.
4. Arthur JR, Boyne R Life Sciences 1985 **36**: 1569-1575.

Revised 07 Oct 09 ck

## Annexe 4 : Manuel du dosage du GPX

MANUAL - GLUTATHIONE PEROXIDASE - RS 504 / RS 505 / RS 506

PAGE 2 OF 2

**NOTE** <sup>(2,3)</sup>

When using human heparinized whole blood, it is recommended that Drabkin's reagent is used for dilution. This is due to the presence of peroxidases in human blood which may give falsely elevated results, and the addition of cyanide serves to inhibit this positive interference. However, dilution of the blood with diluting agent (solution 4) is necessary prior to addition of Drabkin's to convert the glutathione to the reduced form. This is because, in the oxidized form, cyanide will quickly lead to inactivation.

The following method is recommended using double strength Drabkin's:

**Preparation:** Dilute the contents of one vial of Drabkin's reagent with 480 ml of redistilled water. Store protected from light. Stable for 6 months or to expiry date, whichever is the shortest, when stored at +15 to +25°C.

Dilute 0.05 ml heparinized whole blood with 1 ml diluting agent; incubate for 5 minutes and add 1 ml of double strength Drabkin's reagent. Mix well and assay in the normal manner. It is recommended that the samples are assayed within 20 minutes of adding the Drabkin's reagent.

**PROCEDURE**

Wavelength: 340 nm  
Cuvette: 1 cm light path  
Temperature: 37°C  
Measurement: against air

Pipette into cuvette:

	Macro		Semi-Micro	
	Diluted Sample	Reagent Blank	Diluted Sample	Reagent Blank
Diluted Sample	0.05 ml	---	0.02 ml	---
Distilled H <sub>2</sub> O	---	0.05 ml	---	0.02 ml
Reagent	2.50 ml	2.50 ml	1.00 ml	1.00 ml
Cumene	0.10 ml	0.10 ml	0.04 ml	0.04 ml

Mix, read initial absorbance of sample and reagent blank after one minute and start timer simultaneously. Read again after 1 and 2 minutes. Subtract reagent blank value from that of the sample.

**CALCULATION**

Glutathione Peroxidase Concentration may be calculated from the following formula:

$$\text{U/l of Haemolysate} = 8412 \times \Delta A_{340 \text{ nm}} / \text{minute}$$

(See technical brief for example).

**QUALITY CONTROL**

A Ransel Control is recommended for daily quality control. The control should be assayed at least once a day. Values obtained should fall within a specified range. If these values fall outside the range and repetition excludes error, the following steps should be taken:

1. Check instrument settings and light source.
2. Check cleanliness of all equipment in use.
3. Check water, contaminants i.e. bacterial growth may contribute to inaccurate results.
4. Check reaction temperature.
5. Check expiry date of kit and contents.
6. Contact Randox Laboratories Customer Technical Support, Northern Ireland (028) 94422413.

**REFERENCE RANGE**

27.5 - 73.6 U/g Hb  
4171 - 10881 U/l

The range was measured in a European working population. It is recommended that each laboratory should assign its own normal range.

**LINEARITY**

If the absorbance change per minute exceeds 0.1 at 340 nm, dilute sample accordingly with diluting agent, and multiply the result by the dilution factor.

**REFERENCES**

1. Paglia, D.E. and Valentine, W.N., J. Lab. Clin. Med., 1967; 70: 158.
2. Kraus, R.J. & Ganther, H. E. Biochem. & Biophys. Res. Comm 1980; 96: 1118.
3. Prohaska, J.R., Oh, S.H., Hoekstra, W.G. & Ganther, H.E. Biochem. & Biophys. Res. Comm. 1977; 74: 64.

Revised 06/09/05 ne

RANDOX Laboratories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom, BT29 4QY  
Tel: CRUMLIN (028)94422413 Fax: No. INT. 44 (028)94452912 UK (028)94452912  
Email: applications@randox.com Website: www.randox.com



## Annexe 5 : Manuel de l'évaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique

## application

Halosperm® Kit from Halotech Dna, SL is a simple test that allows assessment of sperm DNA fragmentation in humans.

**Principle of the method:**

The method is based on the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test (Fernández et al., J. Androl 24: 59-66, 2003; Fertil Steril 84: 833-842, 2005). Intact unfixed spermatozoa (fresh, frozen/unthawed, diluted samples) are immersed in an inert agarose microgel on a pretreated slide. An initial acid treatment denatures DNA in those sperm cells with fragmented DNA. Following this, the lysing solution removes most of the nuclear proteins, and in the absence of massive DNA breakage produces nucleoids with large halos of spreading DNA loops, emerging from a central core. However, the nucleoids from spermatozoa with fragmented DNA either do not show a dispersion halo or the halo is minimal.

**Description of kit reagents:**

Each kit is sufficient for 10 tests:

- SCS: 10 Super coated slides.
- ACS: 10 Eppendorf tubes with low-melting-point agarose (Agarose Cell Support).
- AD: 1 Tube with acid denaturation solution (Tube labeled AD), 1 ml.
- LS: 1 Bottle of lysis solution, 100 ml.

**Material and equipment required not provided with the kit:**

Bright field or fluorescence microscope, 4°C fridge, 90-100°C and 37°C incubation bath(s), Plastic gloves, Glass slide covers (18 x 18 mm or 22 x 22 mm), Micropipettes, Trays for horizontal incubations, Distilled water, Ethanol 70%, 90%, 100%, Microwave oven and fume hood.

Recommended solution for microscopy visualization:

- Bright field microscopy: Diff Quick stain (several trademarks) or Wright solution (Merck 1.01383.0500).
- Fluorescence microscopy: Fluorochromes for DNA staining.
- Phosphate buffer solution pH 6.88 (Merck 1.07294.1000).
- Mounting medium: Eukit® (Panreac 253681).

**Specimen:**

Samples should be collected in clean containers and the assay should be done as soon as possible. Cryopreserved and frozen samples at -20°C could be also processed. In this case, the sample will be totally thawed, and brought to room temperature before testing, which should be done right after thaw out.

## instructions for use

1. Set the lysis solution (LS) at room temperature (22°C).
2. Dilute the semen sample in culture medium or sperm extender or PBS to a concentration of 5-10 million per milliliter. Be careful that solvent is not extremely dense.
3. Put the agarose eppendorf (ACS) provided through a float; the float should be at the level of the top of the tube. Leave floating in water 5 minutes at 90°-100°C, until the agarose dissolves. Alternatively, the agarose can be melted in a microwave oven.
4. Transfer the agarose eppendorf, with the float, to a temperature controlled water bath maintained at 37°C and leave for 5 minutes until the temperature is even.
5. Add 25 microliters of the semen sample to the agarose eppendorf and mix well. Place the cell suspension from the agarose eppendorf (SCS) on to the treated side of the slide and cover with a glass coverslip, being careful to avoid air bubbles. A drop of 14 or 20 µl for an 18 x 18 mm or 22 x 22 mm coverslip respectively, is recommended. If liquid does not spread till the edge of the coverslip, press gently with the tip of the micropipette.
6. Take care to keep the slide in a horizontal position throughout the entire process.
7. Place the slide on a cold surface (for example, a metal or glass plate pre-cooled at 4°C). Put the cold plate with the slide/s into the fridge at 4°C and leave the sample to gel for 5 minutes.
8. Prepare the denaturant solution (AD). To do this, add 80 microlitres of the contents of the acid denaturation solution (Tube labelled AD) to 10 millilitres of distilled water, mix and place in the incubation tray.
9. Remove the slide cover by sliding it off gently. From now on, wear gloves and use slide horizontally with the help of a lancet.
10. Immediately, immerse the slide into the acid denaturation solution from step 8 in a horizontal position, leaving it to incubate for 7 minutes.
11. Afterwards, place it in another incubation tray containing 10 ml of tempered lysis solution. Incubate for 25 minutes.
12. Pick the slide up and set up horizontally into a tray containing abundant distilled water in order to wash the lysis solution. Leave to incubate for 5 minutes.
13. Place the slide horizontally into a tray with 70% ethanol (2 minutes), followed by 90% ethanol (2 minutes) and finally, 100% ethanol (2 minutes).
14. Leave to dry at room temperature and stain.
15. After drying, the processed slides may be kept in archive boxes at room temperature, in the dark, for months.

*Note: As an internal control, it is recommended to process a microgel with a sample of well-known level of DNA fragmentation. Because two samples can be analyzed on the same slide, a control and sample or two different samples can be co-processed using a single slide.*

### microscopic visualization

For bright field microscopy, it is recommended two types of stain:

- Diff-quick stain, through the following guide: incubate the slide in horizontal position in the Eosin solution, red colour, for 6 minutes. Afterwards, incubate the slide in horizontal position in the Azur B solution, blue colour, for 6 minutes.
- Wright stain, prepare the Wright solution by mixing it in phosphate buffer (1:1). While keeping the slide in horizontal position, cover the sample with a gentle layer of the dyeing solution. Leave it for 10-15 min blowing on it from time to time. Remove the dyeing solution, wash briefly and carefully in tap water and air dry.

Check colouring level under the microscope. Strong staining is preferred, to clearly discriminate the peripheral border of the halo. If staining results are very weak, especially on the region of chromatin dispersion halos, the slide can be re-stained. If colouration is too strong, the slide can be discoloured by washing gently in tap water, or 10% ethanol if preferred. After air dried, it can be dyed again with reduced colouring exposure time. Once the desired level of colouration is achieved and the slide is perfectly dried, it can be mounted in a permanent mounting medium such as Eukit®.

Visualization under fluorescence microscopy is also possible using standard DNA directed fluorochromes.

### sperm classification

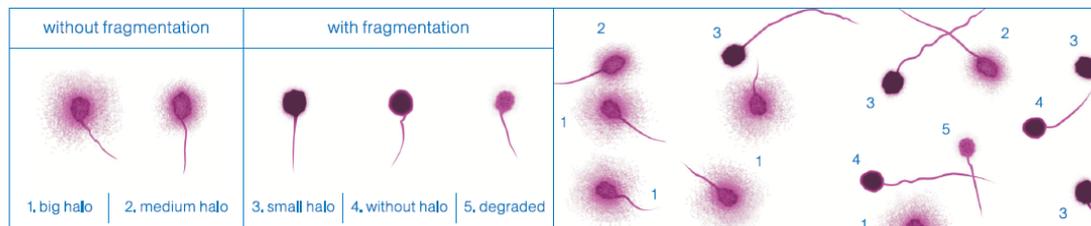
Removal of sperm nuclear proteins results in nucleoids with a central core and a peripheral halo of dispersed DNA loops. The sperm tails remain preserved. For sperm classification we must take into account that sperm DNA fragmentation is a continuous process which produces a series of different halo sizes. Initially, the study of a minimum of 500 spermatozoa per sample is recommended, adopting the criteria of Fernández et al. (Fertil Steril 84: 833-842, 2005). Avoid scoring cells close to the edge of the microgel. Classification:

#### • Spermatozoa without dna fragmentation:

- **spermatozoa with big halo:** those whose halo width is similar or higher than the minor diameter of the core (Figure 1).
- **spermatozoa with medium-sized halo:** their halo size is between those with large and with very small halo (Figure 2).

#### • Spermatozoa with fragmented dna:

- **spermatozoa with small halo:** the halo width is similar or smaller than 1/3 of the minor diameter of the core (Figure 3).
- **spermatozoa without halo:** (Figure 4).
- **spermatozoa without halo and degraded:** those that show no halo and present a core irregularly or weakly stained (Figure 5).
- **"others":** cell nuclei which do not correspond to spermatozoa. One of the morphological characteristics which distinguish them is the absence of tail.



### limitations

This test provides presumptive quantitative information of DNA fragmentation in spermatozoa. This parameter should be analysed by a specialist. The results should be evaluated taking into account all clinical and laboratory findings related to the same sample.

### safety and the environment

#### Attention! Slide processing must be performed under fume hood.

Avoid inhalation and contact with the solutions supplied. The acid solution (AD) contains Hydrochloric acid, and the lysing solution (LS) contains Dithiothreitol and Triton X-100. Consult specifications supplied by manufacturers.

Do not release the products used into the environment. Follow center guidelines for the storage and disposal of toxic substances. Biological samples must be handled as potentially infectious.

### precautions

For professional use only. For research use only.

1. All patient samples and reagents should be treated as potentially infectious and the user must wear protective gloves, eye protection and laboratory coats when performing the test.
2. The test should be discarded in a proper biohazard container after testing.
3. Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and kit reagents are handled.
4. Do not use beyond the expiration date which appears on the package label.
5. It is recommended the use of gloves and face mask.

### storage conditions

The kit should be stored closed at room temperature (2-30°C). Once open, it is recommended to storage lysis solution in the fridge and protected from light, the rest of the components at room temperature. If the kit is stored under these conditions, it will be stable until the expiry date printed on the package label.

Expiration: the reagents supplied are stable for a minimum period of 12 months. It is recommended that solutions be kept well sealed and air tight as much as possible.

Halosperm® is a trade mark by Halotech Dna, SL

Halotech Dna, sl

Parque Científico de Madrid / PTM-c/ Santiago Grisolia 2 / 28760 Tres Cantos (Madrid) / T +34 91 571 35 98 / F +34 91 567 15 57 / www.halotech.es / info@halotech.es

IJHALOSPERM-REV02  
Versión 2 / 2008 13 06

## Annexe 6 : Manuel de l'extraction de l'ADN

## Purification Procedure Using Mini Kit

## Experimental Overview

## Introduction

The procedure for purifying genomic DNA using the PureLink® Genomic DNA Mini Kits is illustrated in the following flow chart.

Prepare lysate using  
Digestion Buffer and  
Proteinase K



Add Lysis/Binding Buffer  
and ethanol to the lysate



Apply sample to a  
PureLink™ Spin Column



Wash the column  
with Wash Buffer 1



Wash the column  
with Wash Buffer 2



Elute DNA with  
Elution Buffer

## Preparing Lysates—Mini Kit

<b>Introduction</b>	<p>Instructions for preparing lysates from mammalian cells and tissues, mouse tail, buccal swabs, blood, bacteria, yeast, FFPE tissues, and Oragene™ preserved saliva are described in the following sections.</p> <p>To obtain high-quality genomic DNA, follow the guidelines recommended on page 11.</p>
<b>Important</b>	<p>Make sure there is no precipitate visible in PureLink® Genomic Digestion Buffer or PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer. If any precipitate is visible in the buffers, warm the buffers at 37°C for 3–5 minutes and mix well to dissolve the precipitate before use.</p>
<b>Materials Needed</b>	<p><i>Components supplied by the user</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 96–100% ethanol</li> <li>• Sample for DNA isolation (see page 12 for recommended starting amount)</li> <li>• Phosphate Buffered Saline (PBS) for mammalian cell lysate (page 43)</li> <li>• Lysozyme and Lysozyme Digestion Buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X-100) for bacterial cell lysate</li> <li>• Zymolase Buffer (1 M sorbitol, 10 mM sodium EDTA, 14 mM β-mercaptoethanol) and Zymolase (lyticase) enzyme for yeast lysate</li> <li>• CitriSolv™ Clearing Agent (Fisher cat. no. 22-143-975) or xylene for FFPE tissue</li> <li>• 3 M sodium acetate (pH 5–5.5) and 2.8 mL isopropanol for Oragene™ samples</li> <li>• Sterile, DNase-free microcentrifuge tubes</li> <li>• Water baths or heat blocks</li> </ul> <p><i>Components supplied with the Kit</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer</li> <li>• PureLink® Genomic Digestion Buffer</li> <li>• Proteinase K (20 mg/mL)</li> <li>• RNase A (20 mg/mL)</li> </ul>

## Preparing Lysates–Mini Kit, Continued

### Blood Lysate

Use the following protocol to prepare lysate from blood samples (nucleated or nonnucleated).

**Note:** If you are processing >200  $\mu$ L blood sample, you need to purchase additional PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and Proteinase K (page 43).

1. Set a water bath or heat block at 55°C.
2. To a sterile microcentrifuge tube, add  $\leq$ 200  $\mu$ L fresh or frozen blood sample (if using <200  $\mu$ L blood sample, adjust the sample volume to 200  $\mu$ L using PBS).  
For processing blood samples >200  $\mu$ L and  $\leq$ 1 mL, scale up all reagent volumes accordingly.
3. Add 20  $\mu$ L Proteinase K (supplied with the kit) to the sample.
4. Add 20  $\mu$ L RNase A (supplied with the kit) to the sample, mix well by brief vortexing, and incubate at room temperature for 2 minutes.
5. Add 200  $\mu$ L PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
6. Incubate at 55°C for 10 minutes to promote protein digestion.
7. Add 200  $\mu$ L 96–100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing for 5 seconds to yield a homogenous solution.
8. Proceed immediately to **Binding DNA** (page 23).

## Purification Procedure Using Spin Columns

### Introduction

The purification procedure is designed for purifying genomic DNA using a spin column-based centrifugation procedure in a total time of **10–15 minutes**.

### Materials Needed

*Components supplied by the user*

- Lysates prepared as described on pages 16–21
- Sterile, DNase-free 1.5-mL microcentrifuge tubes for elution
- Microcentrifuge capable of centrifuging  $>10,000 \times g$
- Optional: sterile water, pH 7.0–8.5, if you are using water for elution

*Components supplied with the Kit*

- PureLink® Genomic Wash Buffers 1 and 2
- PureLink® Genomic Elution Buffer
- PureLink® Spin Columns in Collection Tubes
- PureLink® Collection Tubes



Follow the recommendations below to obtain the best results:

- Perform all centrifugation steps at room temperature
- Review **Elution Parameters** on page 13 to determine the suitable elution volume for your requirements
- Perform a 1 minute incubation step with PureLink® Genomic Elution Buffer
- Be sure to perform the recommended wash steps to obtain the best results
- If you are using water for elution, always use sterile water, pH 7.0–8.5

### Before Starting

Add 96–100% ethanol to PureLink® Genomic Wash Buffer 1 and PureLink® Genomic Wash Buffer 2 according to instructions on each label. Mix well. Mark on the labels that ethanol is added. Store both wash buffers with ethanol at room temperature.

### Binding DNA

1. Remove a PureLink® Spin Column in a Collection Tube from the package.
2. Add the lysate (~640  $\mu$ L) prepared with PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and ethanol to the PureLink® Spin Column.
3. Centrifuge the column at  $10,000 \times g$  for 1 minute at room temperature.  
**Note:** If you are processing  $>200 \mu$ L starting material such as blood, buccal swabs, or Oragene™ preserved saliva, you need to perform multiple loading of the lysate by transferring any remaining lysate to the same PureLink® Spin Column (above) and centrifuge at  $10,000 \times g$  for 1 minute.
4. Discard the collection tube and place the spin column into a clean PureLink® Collection Tube supplied with the kit.
5. Proceed to **Washing DNA**, page 24.

---

## Purification Procedure Using Spin Columns, Continued

- 
- |                    |  |
|--------------------|--|
| <b>Washing DNA</b> | <ol style="list-style-type: none"><li>1. Add 500 <math>\mu</math>L Wash Buffer 1 prepared with ethanol (page 23) to the column.</li><li>2. Centrifuge column at room temperature at <math>10,000 \times g</math> for 1 minute.</li><li>3. Discard the collection tube and place the spin column into a clean PureLink<sup>®</sup> collection tube supplied with the kit.</li><li>4. Add 500 <math>\mu</math>L Wash Buffer 2 prepared with ethanol (page 23) to the column.</li><li>5. Centrifuge the column at maximum speed for 3 minutes at room temperature. Discard collection tube.</li><li>6. Proceed to <b>Eluting DNA</b>.</li></ol>   |
| <b>Eluting DNA</b> | <ol style="list-style-type: none"><li>1. Place the spin column in a sterile 1.5-mL microcentrifuge tube.</li><li>2. Add 25–200 <math>\mu</math>L of PureLink<sup>®</sup> Genomic Elution Buffer to the column. See <b>Elution Parameters</b> (page 13) to choose the suitable elution volume for your needs.</li><li>3. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column at maximum speed for 1 minute at room temperature. <i>The tube contains purified genomic DNA.</i></li><li>4. To recover more DNA, perform a second elution step using the same elution buffer volume as first elution in another sterile, 1.5-mL microcentrifuge tube.</li><li>5. Centrifuge the column at maximum speed for 1.5 minutes at room temperature.<br/><i>The tube contains purified DNA. Remove and discard the column.</i></li></ol> |
| <b>Storing DNA</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Store the purified DNA at <math>-20^{\circ}\text{C}</math> or use DNA for the desired downstream application.</li><li>• For long-term storage, store the purified DNA in PureLink<sup>®</sup> Genomic Elution Buffer at <math>-20^{\circ}\text{C}</math> as DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.</li><li>• To avoid repeated freezing and thawing of DNA, store the purified DNA at <math>4^{\circ}\text{C}</math> for immediate use or aliquot the DNA and store at <math>-20^{\circ}\text{C}</math> for long-term storage.</li></ul>   |
-

## Annexe 7 : Manuel du screening des microdélétions du chromosome Y



## A. Reaction Setup

See Figure 2 for a flow chart summary of the reaction setup protocol. In this procedure, aliquots of the sample DNAs are placed in a reaction tube. Separately, *Taq* DNA polymerase is added to each of the Multiplex Master Mixes. Then the Multiplex Master Mix containing *Taq* DNA polymerase is added to the reaction tubes containing the sample DNA. Each DNA sample is analyzed using each of the five Multiplex Master Mixes.

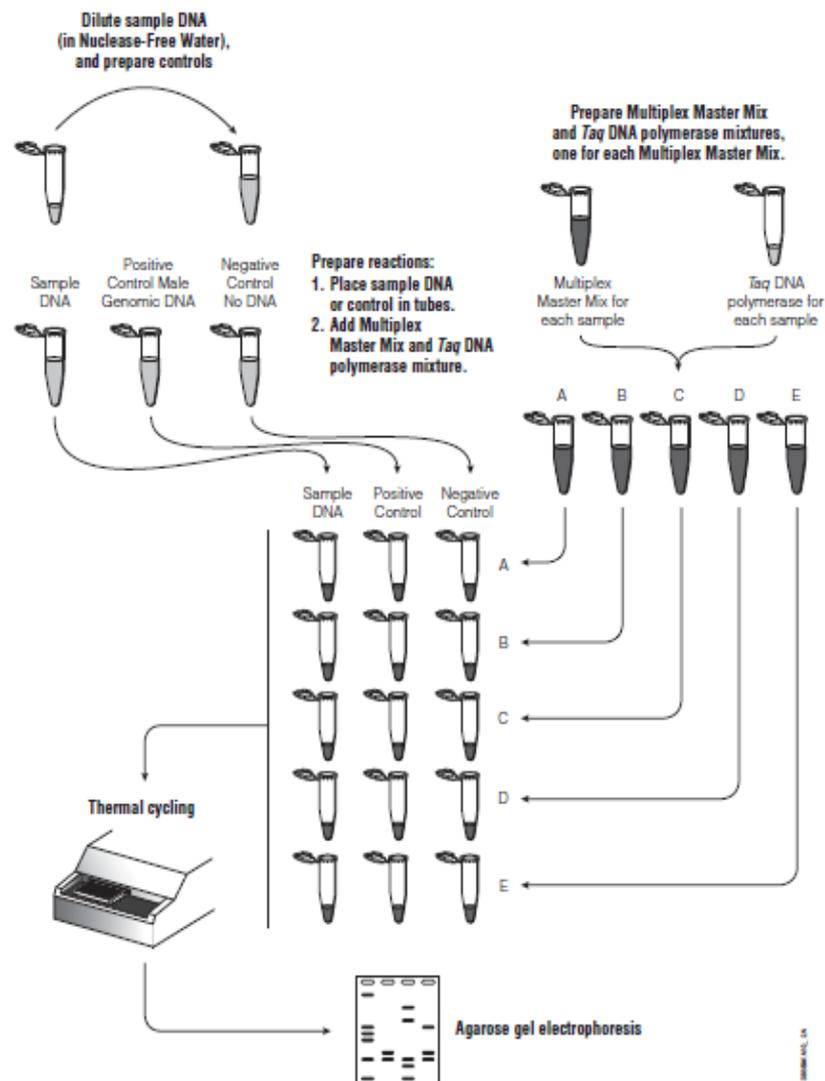


Figure 2. Schematic representation of the Y Chromosome AZF Analysis System assay.



Promega

ENGLISH

1. Thaw the Multiplex Master Mixes, Nuclease-Free Water, and Male Genomic DNA on ice. Once thawed, store on ice. Vortex the Multiplex Master Mixes for 5–10 seconds before use.
2. Complete the table below to determine the number of reactions for each Multiplex Master Mix. For each DNA sample there will be five reaction tubes, one for each Multiplex Master Mix. Include a positive Male Genomic DNA control and a negative no-DNA control for each Multiplex Master Mix.

Multiplex Master Mix	# of Sample DNAs	Positive Control Male Genomic DNA	Negative Control No DNA	Total Reaction Tubes
A		1	1	
B		1	1	
C		1	1	
D		1	1	
E		1	1	

3. Set up and label the required number of reaction tubes as determined above. Use thin-walled amplification tubes. Place the reaction tubes on ice.
4. In a separate tube, dilute each sample DNA to 10ng/μl using the supplied Nuclease-Free Water. Mix well by vortexing for 5–10 seconds. Add 5μl diluted DNA to the appropriately labeled reaction tubes on ice.
 

**Positive Control DNA Sample:** For the positive control Male Genomic DNA sample, dilute the Male Genomic DNA to 10ng/μl by adding 6μl of Male Genomic DNA to 24μl of Nuclease-Free Water. Mix well by vortexing for 5–10 seconds. Add 5μl to appropriately labeled reaction tubes on ice.

**Negative Control No-DNA Sample:** For the negative control (no DNA), add 5μl of Nuclease-Free Water to the appropriately labeled reaction tubes on ice.
5. Prepare five Multiplex Master Mix/GoTaq® DNA polymerase mixtures on ice, one for each Multiplex Master Mix. Vortex the Multiplex Master Mixes before using them.

Component	Volume per Reaction	Volume per 10 Reactions
Multiplex Master Mix	20μl	200μl
GoTaq® DNA polymerase (5u/μl)	0.2μl	2μl
final volume	20.2μl	202μl

6. Vortex to mix.
7. Add 20μl of the Multiplex Master Mix/GoTaq® DNA polymerase mixture to the appropriate reaction tubes, which contain the sample DNA or controls, on ice.
8. Gently vortex to mix.
9. Centrifuge the tubes briefly to bring the contents to the bottom of the tubes. Place reaction tubes on ice until ready for thermal cycling.
10. Thermal cyclers without a heated lid (for example, the Perkin-Elmer Model 480 thermal cycler) require a mineral oil overlay of the reactions in the reaction tube. Tilt the tubes and add one drop of oil to the side of the tube, letting the oil run down the side of the tube.



### B. Optimal PCR Thermal Cycling Protocol for the Perkin-Elmer Model 480 Thermal Cycler

The following protocol was optimized for the Perkin-Elmer Model 480 Thermal Cycler. The user is responsible for protocol optimization and validation if using a different thermal cycler.

It is crucial to preheat the instrument to 94°C before placing tubes into the machine.

Thermal Cycler	Reaction Tubes	DNA Polymerase	PCR Conditions
Model 480	0.5ml GeneAmp® thin-walled reaction tubes	GoTaq® DNA Polymerase	94°C for 2 minutes, then: 94°C for 1 minute 57°C, for 30 seconds 72°C for 1 minute Repeat for 35 cycles then: 72°C for 5 minutes 4°C soak

### C. Agarose Gel Electrophoresis

4% NuSieve® 3:1 Plus TBE buffer precast Reliant® minigels (Cambrex Cat.# 54927, 54928 or 54929) are required for electrophoresis and subsequent optimal visualization of amplification products.

1. Dilute molecular weight marker as follows:

Component	Volume
50bp DNA Step Ladder	12µl
Blue/Orange 6X Loading Dye	4µl
Nuclease-Free Water	8µl

2. Add 2.5µl of the Blue/Orange 6X Loading Dye to each amplification tube and mix.
3. Load 10µl of the diluted molecular weight marker onto the first well of the gel.
4. Load 10µl/well of each sample.
5. Load 10µl of diluted molecular weight marker onto the last well of the gel.
6. Run the gel in 1X TBE containing 0.5µg/ml ethidium bromide at 5V/cm (measured as the distance between the electrodes) until the bromophenol blue dye front migrates to the bottom of the gel.
7. Photograph the gel using a UV transilluminator (320nm).

## Annexe 8 : La publication



Systems Biology in Reproductive Medicine



ISSN: 1939-6368 (Print) 1939-6376 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/iaan20>

## Association of CAT-262C/T with the concentration of catalase in seminal plasma and the risk for male infertility in Algeria

Nour El Houda Bousnane, Sadiq May, Mouloud Yahia & Abed Alkarem Abu Alhajja

To cite this article: Nour El Houda Bousnane, Sadiq May, Mouloud Yahia & Abed Alkarem Abu Alhajja (2017): Association of CAT-262C/T with the concentration of catalase in seminal plasma and the risk for male infertility in Algeria, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, DOI: [10.1080/19396368.2017.1318187](https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1318187)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/19396368.2017.1318187>

 [View supplementary material](#)

 [Published online: 24 Apr 2017.](#)

 [Submit your article to this journal](#)

 [View related articles](#)

 [View Crossmark data](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iaan20>

Download by: [92.241.51.134]

Date: 24 April 2017, At: 12:47

## RESEARCH COMMUNICATION

## Association of CAT-262C/T with the concentration of catalase in seminal plasma and the risk for male infertility in Algeria

Nour El Houda Bousnane<sup>a</sup>, Sadiq May<sup>b</sup>, Mouloud Yahia<sup>a</sup>, and Abed Alkarem Abu Alhaija<sup>b</sup><sup>a</sup>Laboratory of Bioactive Molecules and Cellular Pathophysiology, Faculty of Natural and Life Sciences, Department of Biology of Organisms, Batna University, Algeria; <sup>b</sup>Faculty of Sciences, Department of Biological Sciences, Yarmouk University, Irbid, Jordan**ABSTRACT**

Catalase (CAT) plays a central role in the protection of different cell types against the deleterious effects of hydrogen peroxide. In human, CAT is implicated in many physiological and pathological conditions including idiopathic male infertility. In this study we examined the association between CAT levels in seminal plasma with different sperm parameters and with CAT-262 C/T polymorphism and their risk for idiopathic male infertility in Algeria. Semen and blood samples were obtained from 111 infertile males and 104 fertile controls from the region of Eastern Algeria following informed consent. Standard semen parameters, DNA integrity, and CAT concentration in seminal plasma were evaluated. CAT-262C/T genotypes were screened using allele specific PCR. Seminal CAT activity was significantly different ( $p < 0.0001$ ) between infertile males and controls, it was also markedly decreased in oligo-astheno-teratozoospermia ( $p < 0.0001$ ), azoospermia ( $p < 0.0001$ ), and normozoospermia ( $p = 0.045$ ) subgroups compared to controls. Positive correlations between CAT activity and semen parameters (volume, motility, concentration, and morphology) were detected, but not with sperm DNA integrity. There was no direct association between CAT-262C/T polymorphism and general male infertility. However, the results presented in this study showed that CAT activity is remarkably associated with the CAT-262T allele ( $p = 0.001$ ) and the different CAT-262C/T genotypes. This study highlighted the major differences in the seminal plasma CAT content between infertile and fertile males and the differences of CAT concentration between different CAT-262C/T genotypes carriers.

**ARTICLE HISTORY**

Received 22 November 2016  
Revised 14 February 2017  
Accepted 17 March 2017

**KEYWORDS**

Algeria; CAT-262C/T polymorphism; catalase; male infertility; semen parameters

**Introduction**

Male infertility is a polygenic multifactorial syndrome; about 15% of couples trying to achieve a pregnancy are affected by infertility [Ferlin et al. 2006; Trussell 2013], almost half of these cases account for male factor [Sharlip et al. 2002]. In male infertility, some abnormalities can be detected during semen analysis that can be used as predictors of male infertility risk factors. These include oligozoospermia (<15 million spermatozoa/mL), asthenozoospermia (<40% motile spermatozoa), teratozoospermia (<4% normal forms), and quite often, all three pathologies occur simultaneously as oligo-astheno-teratozoospermia (OAT) syndrome. Other cases include necrozoospermia (percentage of vital spermatozoa is less than 58%) and azoospermia in which there is a total absence of spermatozoa in the ejaculate [WHO 2010].

Deterioration of male fertility potential is linked with oxidative stress because spermatozoa with abnormal morphology have an increased ability to generate reactive oxygen species (ROS), but have a reduced

antioxidant capacity [Tremellen 2008]. Oxidants interfere with normal sperm function via membrane lipid peroxidation and fragmentation of nucleic acids, which result in sperm alteration and dysfunction leading to a reduction in semen parameters such as sperm motility and its ability to bind and fuse with the oocyte [Agarwal et al. 2005; Nabil et al. 2008; Makker et al. 2009].

Seminal plasma contains antioxidants that are free radical scavengers that protect sperm cells against oxidative stress. Antioxidant enzyme activities and polymorphisms in antioxidant genes are becoming associated with numerous diseases, especially those with unknown causes. Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) plays an integral role in the primary defense against oxidative stress, as it catalyzes the decomposition of  $H_2O_2$  to  $O_2$  and  $H_2O$  [Kodydkova et al. 2014; Saadat et al. 2014].

A CAT-262 C/T (rs1001179) single nucleotide polymorphism upstream of the CAT gene transcription site has already been described [Forsberg et al. 2001] and its association with CAT activity was reported in different populations in different pathological conditions such as

**CONTACT** Nour El Houda Bousnane  hodanorei20@hotmail.fr  PB number 08 Mebarki, Batna, Algeria.

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2017 Taylor & Francis

Alzheimer [Goulas et al. 2002] and vitiligo development [Casp et al. 2002; Gavalas et al. 2006; Schallreuter et al. 2012]. A link between deficient seminal CAT activity and male infertility [Tremellen 2008] as well as an association between *CAT*-262 C/T and altered blood CAT levels have been reported [Forsberg et al. 2001; Komina et al. 2012], otherwise only one study has reported an association between *CAT*-262T/T genotype with less susceptibility to male infertility in Iranian men [Sabouhi et al. 2015], no other previous studies had been reported in relation to CAT activity in seminal plasma and its association to *CAT*-262 C/T polymorphism.

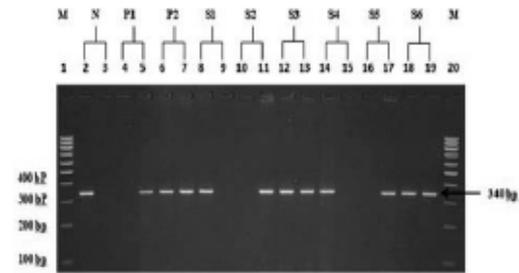
Taking into account the preceding facts and the reality that the Algerian population is not well studied concerning the risk factors for male infertility, the objective of this study was to investigate the association between the different *CAT* -262C/T genotypes and CAT levels in seminal plasma and to search for a possible association between these two parameters and male infertility.

## Results and discussion

The present case-control study is the first to be conducted on the Algerian population that included two groups of age matched 111 infertile men and 104 fertile controls from Batna city in the eastern mountainous part of Algeria. We evaluated the activity of CAT in seminal plasma and its association with sperm DNA fragmentation and some selected semen parameters that could be predictors of ROS damage in our population. In addition, we analyzed *CAT* polymorphism -262C/T (rs 1001179) in all the subjects in an attempt to search for its possible association with the concentration of CAT in seminal plasma as well as its association with male infertility. An example is shown in Figure 1.

Demographic characteristics of cases and controls including age, smoking, and body mass index (BMI) are presented in Table 1, that shows no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) in their distributions between the cases and the controls. This result excludes any implication of the indicated characteristics in possible pathological condition causing male infertility and highlights the significance of the coming comparisons of the semen parameters and CAT activities between infertile men and controls.

As shown in Table 2, semen volume was not statistically different ( $p = 0.331$ ) between the cases and the controls, in comparison to all other semen parameters that showed significantly lower values in infertile males compared to those in the controls. The concentration



**Figure 1.** Representative results of the AS-PCR assay for the *CAT* -262 C/T polymorphism resolved on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Lanes 1 and 20: 100 bp DNA ladder marker (M). S1 through S6 represent samples from our results. N represents a negative control. P1 represents heterozygote positive control. P2 represents homozygote positive control. For each control and all representative samples the left well (even numbers) contained the amplified PCR products using the wild type primer, while the right lanes (odd numbers) contained products using mutant primer (with no DNA product).

**Table 1.** Demographic characteristics of the studied population.

Characteristics	Cases (n=111)	Controls (n=104)	P-Value
Age (Mean $\pm$ SD) (Years)	35.86 $\pm$ 5.73	37.04 $\pm$ 6.72	0.169
BMI (Mean $\pm$ SD) (Kg/m <sup>2</sup> )	25.84 $\pm$ 4.17	27.18 $\pm$ 3.30	0.10
Smoking status			
YES (n)	52	46	0.748
NO (n)	59	58	

BMI: body mass index; P-value significant when  $\leq 0.05$ .

**Table 2.** Semen parameters, percentage of DNA fragmentation, and catalase (CAT) activity in the infertile men and controls.

Characteristics (Mean $\pm$ SD)	Cases (n=111)	Controls (n=104)	P-Value
Volume (mL)	3.21 $\pm$ 1.51	3.92 $\pm$ 1.34	0.331
Mobility (%)	35.15 $\pm$ 29.08	62.26 $\pm$ 17.73	<0.0001
Vitality (%)	35.80 $\pm$ 27.89	62.88 $\pm$ 17.84	<0.0001
Concentration (10 <sup>6</sup> /mL)	31.02 $\pm$ 44.08	43.44 $\pm$ 29.20	0.017
Typical Morphology (%)	12.12 $\pm$ 12.04	31.86 $\pm$ 9.94	<0.0001
DNA Fragmentation (%)	19.389 $\pm$ 12.15	17.03 $\pm$ 4.21	0.062
CAT Concentration (U/mL)	12.54 $\pm$ 4.43	17.59 $\pm$ 4.52	<0.0001

P-value significant when  $\leq 0.05$ .

of seminal plasma CAT in the controls was statistically higher than that in the cases (17.59  $\pm$  4.523 U/mL and 12.54  $\pm$  4.43 U/mL, respectively,  $p < 0.0001$ ). After classification of the infertile cases according to semen parameter values [WHO 2010], four subgroups were obtained: normozoospermia ( $n = 22$ ), azoospermia ( $n = 26$ ), oligo-astheno-teratozoospermia ( $n = 42$ ), and necrozoospermia ( $n = 21$ ). Table 3 shows the results of the comparison of demographic criteria, semen parameters, DNA fragmentation, and seminal CAT activity in subgroups of infertile men with fertile controls. Low CAT activity was a general trend in our infertile male population, a significant decrease was observed in this enzyme activity in the first three subgroups compared to controls ( $p < 0.05$ ). However, the CAT activity in

**Table 3.** Demographic criteria, semen characteristics, DNA integrity, and Catalase (CAT) activity in the infertile men subgroups and results of their comparison with fertile controls.

Characteristics	Normozoospermia (n=22)	Azoospermia (n= 26)	O-A-teratozoospermia (n=42)	Necrozoospermia (n=21)
	spe	per	per	per
Age (Years)	37.59 ± 6.28	35.92 ± 6.17	<b>34.55 ± 5.45<sup>a</sup></b>	36.62 ± 4.83
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	25.58 ± 4.25	25.71 ± 4.85	26.47 ± 4.11	<b>25.03 ± 3.35<sup>f</sup></b>
Volume (mL)	<b>3.25 ± 1.57<sup>a</sup></b>	<b>2.66 ± 1.22<sup>c</sup></b>	3.27 ± 1.47	3.76 ± 1.72
Mobility (%)	55.31 ± 15.55	/	<b>28.90 ± 19.68<sup>e</sup></b>	70.04 ± 13.76
Vitality (%)	64.22 ± 11.09	/	<b>46.42 ± 21.61<sup>e</sup></b>	<b>29.09 ± 18.80<sup>e</sup></b>
Concentration (10 <sup>6</sup> /mL)	<b>62.78 ± 6.60<sup>b</sup></b>	<b>00</b>	<b>16.14 ± 6.57<sup>c</sup></b>	<b>62.95 ± 24.29<sup>g</sup></b>
Typical Morphology (%)	<b>21.63 ± 11.99<sup>c</sup></b>	/	<b>8.90 ± 9.23<sup>c</sup></b>	<b>23.61 ± 4.57<sup>c</sup></b>
DNA Fragmentation (%)	<b>21.50 ± 7.53<sup>c</sup></b>	/	<b>29.16 ± 5.83<sup>c</sup></b>	18.74 ± 2.80
CAT Concentration (U/mL)	<b>15.54 ± 3.12<sup>d</sup></b>	<b>7.75 ± 3.16<sup>c</sup></b>	<b>11.99 ± 3.06<sup>c</sup></b>	16.38 ± 3.06

<sup>a</sup>p= 0.04; <sup>b</sup>p= 0.033; <sup>c</sup>p≤ 0.0001; <sup>d</sup>p= 0.045; <sup>e</sup>p= 0.035; <sup>f</sup>p= 0.008 in comparison with controls; <sup>g</sup>p=0.005; P-value significant when ≤ 0.05.

necrozoospermia patients compared with controls did not reach a significant level ( $p=0.245$ ), this can be attributed to a compensatory mechanism to preserve sperm vitality and inhibit cell death. By definition the sperm parameters of the OAT group was the most different ( $p\leq 0.001$ ) since it gathers simultaneously three types of sperm abnormalities. But generally speaking, there were different levels of variation between each subgroup and controls and the biggest differences were regarding the sperm concentration, vitality, and the percentage of spermatozoa with typical morphology which had been regarded as the most important criteria for normal fertilizing ability.

Our results revealed a significant difference in CAT activity in the seminal plasma between the infertile men and controls ( $p<0.0001$ ) and between three out the four infertile subpopulations and controls ( $p<0.05$ ). These results were biologically reasonable and highlighted the central role of CAT in detoxification of ROS and its protection of spermatozoa integrity, in agreement with and supported those reported by Khosrowbeygi et al. [2004] who showed that an altered CAT state can have a significant role in the etiology of impaired sperm function. Our results also supported those of Zelen et al. [2010], in which they showed fertile donors had significantly higher CAT activities in seminal plasma than infertile men. Our results also supported those of Ramya et al. [2011]. They observed that CAT activities were attenuated in all infertile groups. Al-Azzawie et al. [2014] also observed a significant decrease of seminal CAT activity in two male infertility subgroups: severe oligozoospermia and asthenozoospermia compared with controls. However, contrary to our findings, Zini et al. [2000] reported no such difference in CAT-like activities between fertile and infertile males, and Tavilani et al. [2008] did not note any significant differences in the concentrations of CAT in seminal plasma between asthenozoospermic and controls. These contradictory results could be due to many variables such as genetic background, sample size, age, and

BMI of the studied subjects, and/or the inclusion and exclusion criteria with the abstinence time, that strongly modify the composition of seminal plasma.

Overall, the amount of seminal CAT in the control group and its decrease in infertile men in general and most of the male infertility subgroups may be due to the increased turnover of this enzyme as a way for preventing oxidative damage. Also, it confirmed the positive contribution of CAT as a strong antioxidant to maintain sperm quality so it could be a useful tool in the management of male infertility. This hypothesis is in agreement with many literature data, which indicated that CAT provides the most effective antioxidant protection against the effects of free radicals when the sperm cells are incubated in systems producing oxygen radicals [Gagnon et al. 1991; Aitken et al. 1993; Plante et al. 1994].

The study of correlations shows that the concentration of CAT in the seminal plasma of the infertile men is positively associated with the most important criteria for normal fertilizing ability to the spermatozoa including: sperm concentration ( $p<0.0001$ ,  $r = 0.348$ ), sperm vitality ( $p<0.0001$ ,  $r = 0.510$ ), sperm mobility ( $p<0.0001$ ,  $r = 0.585$ ), and percentage of typical sperm morphology ( $p<0.0001$ ,  $r = 0.599$ ), but not with sperm DNA fragmentation ( $p=0.122$ ,  $r = 0.106$ ). Our results were consistent with many others in the literature, such as Sanocka et al. [1997], Khosrowbeygi et al. [2004], Kawakami et al. [2007], and Samant Parinecta et al. [2009].

In light of such an important role of the seminal plasma for sperm function, the expression of the CAT gene as well as the CAT gene product in seminal plasma were found in association with some semen quality parameters such as sperm morphology and progressive mobility [Macanovic et al. 2015]. However, the absence of any association between seminal CAT and DNA integrity of spermatozoa in our results and those of Hammadeh et al. [2008], are consistent with a protective effect of the tight packaging of sperm DNA with

protamines that makes it more resistant to free radical attack than other cell types [Olivia 2006].

Allelic frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. The genotypes and allele distribution with the odd ratios (ORs) for the infertile males (cases) and controls are summarized in Table 4, which shows that the frequencies of both alleles and the different genotypes in the infertile cases and the controls were not statistically different ( $p > 0.05$ ). CAT activity was remarkably different between the three genotypic groups,  $12.92 \pm 4.98$  U/mL in the CT and  $10.73 \pm 5.40$  U/mL in the TT genotypic groups which were significantly lower than CAT activity in the CC genotypic group  $14.23 \pm 4.34$  ( $p = 0.001$ ). The lack of association between the different CAT -262C/T genotypes and the risk of male infertility in our Algerian study does not support an Iranian report [Sabouhi et al. 2015] in which CAT-262T/T genotype confers less susceptibility to male infertility.

Regarding the screening of the different CAT-262C/T genotypes in our population, subjects with the CC genotype were found to be the most frequent (Table 4) followed by the CT and TT genotypes, respectively. This is in agreement with different previous studies in Swedish population (52% CC, 31% CT, and 7% TT), Germans (59.8 CC, 34.2% CT, and 6% TT), and Russians (69% CC, 25% CT, and 6% TT) [Forsberg et al. 2001; Zarbock et al. 2007; Komina et al. 2012]. While in the Iranian study [Sabouhi et al. 2015] the CT genotype presented the highest frequency in both infertile and control groups, consistent with the differences between our populations. In the supplementary data (Supplemental Tables 1 and 2), additional information about the CAT gene and CAT-262C/T polymorphism related to male infertility is provided.

To our knowledge, our study is the first to search for the presence of a link between CAT-262C/T genotypes and CAT activity in seminal plasma of infertile men. Our most relevant findings were the detection of the highest CAT concentrations in individuals carrying the wild type CAT-262C/C genotype and lower concentrations in the carriers of the CAT-262CT and CAT-262TT genotypes. This is in agreement with different

studies in which CAT blood activity was higher in CC homozygotes compared to those carrying the T allele either in hetero or homozygotic states [Ahn et al. 2005; Nadif et al. 2005; Perianayagam et al. 2007; Komina et al. 2012].

The results presented in this study in which a lower seminal CAT activity was associated with the CAT-262T allele is consistent with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced enzyme inactivation [Gibbons et al. 2006]. Consequently, decreased CAT expression in the CAT mutant allele carriers may lead to further attenuating CAT activity; this is in agreement with the report of Komina et al. [2012] and Ji et al. [2012a] in which this mutant CAT -262C/T polymorphism had been associated with lower CAT activity and thus increased the levels of ROS. This is also in agreement with the suggestion that a single nucleotide polymorphism located in the promoter region can affect not only CAT expression but also its activity as suggested by Liu et al. [2010]. Decreased CAT activity impairs detoxification of free radicals that may lead to an increased formation of hydroxyl radicals and an elevated risk to many disorders [Ahn et al. 2005; Mak et al. 2007] including male infertility as our results had indicated. Other studies also confirmed the significant interactions between several polymorphisms in the antioxidant genes and an increased risk of male infertility [Ji et al. 2012b]. As reported here, our study remains the first to highlight the deleterious effect of CAT -262C/T on seminal CAT activity in infertile males and provides evidence that this enzyme is necessary to maintain sperm quality.

As presented above, the study has revealed that the concentration of CAT in the seminal plasma of infertile men is significantly associated with sperm quality including concentration, sperm vitality, sperm motility, percentage of typical sperm forms, but not with sperm DNA fragmentation, which indicated that CAT has an essential role in maintaining normal sperm parameters. The decreased concentration of this antioxidant enzyme in three out of the four male infertility subgroups (normozoospermia, azoospermia, and OAT) supports the hypothesis that deficient catalase status can be an important causative factor in the pathogenesis of male infertility.

**Table 4.** CAT-262C/T genotypes and allele frequencies of the infertile cases and controls.

Genotype	Cases	Controls	OR	(95% CI)	P-value
	n (%)	n (%)		Reference	
CC	77 (74%)	82 (73.9%)		Reference	
CT	24 (23.1%)	25 (22.5%)	0.946	(0.515 - 8.56)	0.946
TT	3 (2.9%)	4 (3.6%)	1.252	(0.271 - 5.776)	0.773
CT+TT	27 (26%)	29 (26.1%)	1.009	(0.653 - 1.560)	0.966
Allele C	178 (85.6%)	189 (85.1%)	0.997	(0.687 - 1.447)	0.988
Allele T	30 (12.4%)	33 (14.9%)	1.033	(0.576 - 1.852)	0.913

OR: odds ratio; CI: confidence interval. P-value significant when  $\leq 0.05$ .

Our study showed for the first time that there was no direct association between *CAT*-262C/T polymorphism and general male infertility in Algeria; however, we reported that *CAT* -262T has a deleterious effect on seminal *CAT* activity in infertile patients. These results could provide a base for further research on the negative effect of the *CAT*-262T allele on seminal *CAT* activity and male factor infertility. Although the evaluation of antioxidants is not yet a routine in clinical practice, our results highlighted the importance of seminal *CAT* in maintaining a good sperm quality. Further, it supported the possibility that this enzyme may provide a useful tool for the management of male infertility.

## Materials and methods

### Subjects

A total of 111 men suffering from idiopathic male infertility (cases) and 104 healthy fertile controls with regular semen parameters volunteered and were recruited from the University Hospital of Batna and private laboratories from the same city in the Middle East of Algeria. A detailed medical history and andrological examination was performed for all studied controls and cases, also detailed questionnaires were given to discard any female contribution in these infertility cases. We excluded from the study infertile men who had recognizable causes of male infertility; obstructive azoospermia, chromosomal aberrations, hypogonadism, hormonal disorders, and infections. Also, subjects under antioxidant supplementation during the period of the study were excluded. The effects of variations in different parameters (genetic background, sample size, age, and BMI of the studied subjects, and inclusion and exclusion criteria and abstinence time) which strongly modify the composition of seminal plasma, were avoided by making very rigorous inclusion criteria to eliminate any causes affecting semen quality and antioxidant status. These criteria included age- and BMI-matched cases and controls groups, equivalence in the number of the control and the cases groups, potentially sufficient size of the studied samples, which came from the same homogeneous population that originated from the same geographic region, and finally by matching the abstinence time to three days for all the cases and controls. The study was approved by the Scientific Committee of Batna 2 University. Informed written consent was obtained from each of the subjects participating in this study and the protocols and procedures used in this research were in compliance with the Declaration of Helsinki.

### Semen samples and processing

Semen samples were collected in sterile containers by masturbation, after three d of sexual abstinence. Within an hour from ejaculation, the samples were analyzed for semen quality (volume, motility, concentration, and morphology) according to the World Health Organization (WHO) [2010] manual. Semen was centrifuged to separate the seminal plasma which was liquated and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  till use.

### DNA integrity evaluation

DNA integrity was evaluated by the sperm chromatin dispersion (SCD) test using a special kit (Halosperm kit, Halotech Dna S.L, Spain) according to Fernandez et al. [2005]. A 25  $\mu\text{L}$  sample of diluted semen (5-10 million spermatozoa /mL) was added to an Eppendorf tube containing dissolved agarose, 20  $\mu\text{L}$  of this suspension were placed on a treated slide and covered with glass coverslip. The slide was left to gel in horizontal position for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . After solidification, the coverslip was removed and the slide was incubated respectively into acid denaturation solution (7 min), lysis solution (25 min), and abundant distilled water (5 min). Finally, the slide was placed horizontally into a tray containing 70% ethanol (2 min), followed by 90% (2 min), and finally 100% ethanol (2 min) and left to dry at room temperature. The last step consisted of staining the slide to be observed under bright field microscope using Diff-quick stain. Removal of sperm nuclear proteins results in nucleotides with central core and peripheral halo of dispersed DNA loops. Spermatozoa were classified according to the presence/absence or the diameter of the halo observed around their head. A study of at least 500 spermatozoa per slide was performed to obtain a representative percentage of sperm DNA fragmentation for each sample.

### CAT activity measurement

*CAT* activity was measured according to the method of Aebi [1984]. In the ultraviolet range  $\text{H}_2\text{O}_2$  shows a continual increase in absorption with decreasing wavelength. The decomposition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  can be followed directly by the decrease in absorbance at 240 nm ( $\epsilon_{240} = 0.00394 \pm 0.0002 \text{ liters mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$ ). The difference in absorbance ( $\Delta A_{240}$ ) per unit time is a measure of the catalase activity.

We measured a preparation containing 2 mL of diluted seminal plasma (1:10) and 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) against a blank containing 1 mL phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) instead of substrate and 2 mL diluted seminal plasma. The reaction was started by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The initial absorbance should be approximately A = 0.500. The decrease in absorbance was followed at a wavelength of 240 nm. CAT activity was then calculated from the change in absorbance within 3 min and finally expressed as U/ml. A unit of CAT activity was defined as the amount of CAT which was absorbed in 30 sec at room temperature.

#### Blood samples and DNA extraction

Venous blood (5 mL) were collected in an EDTA tube from each of the participated subjects, then immediately separated in aliquots and stored at -80°C until use. Genomic DNA was extracted from frozen blood according to the manufacturer's instructions using the "PureLink Genomic DNA Mini Kit" from Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA). DNA concentration and purity were measured before storing the DNA at 4°C until molecular analysis.

#### Genotyping of CAT-262 C/T

CAT polymorphism -262 C/T (rs 1001179) was determined using the allele-specific PCR (AS-PCR) assay as described by Khodayari et al. [2013]. Primers were obtained from Gene Link USA (Hawthorne, NY, USA). Forward primer specific for allele C detection "rs 1001179 C": 5'-GCCCTGGTTTCGGCTATC-3', forward primer specific for allele T detection "rs 1001179 T": 5'-GCCCTGGTTTCGGCTATT-3', and common reverse primer "rs 1001179 R": 5' GGTTCGCTGTGC AGAACACT-3'.

Two PCR reactions were run in parallel for each sample, one with primers "rs 1001179 C" and "rs 1001179 R" and a second with "rs 1001179 T" and "rs 1001179 R", each containing 12.5 µL of GoTaq Green master mix 2X (Promega, San Luis Obispo, CA, USA), 0.5 µL of MgCl<sub>2</sub> (Promega), 8 µL of free nucleases H<sub>2</sub>O (Promega), and 1 µL genomic DNA (40 ng) in a final volume of 25 µL. PCR conditions included initial heating at 95°C for 5 min, followed by 38 cycles each consisting of 95°C for 30 s, 62°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension step at 72°C for 5 min. The PCR products were electrophoresed in 2% Tris-Borate-EDTA/ethidium bromide agarose gel and visualized under UV illumination. The presence of a 340-bp band in PCR C or T indicated the presence of the allele.

A sample was considered negative for a particular allele when the amplicon was absent (Figure 1).

#### Statistical analysis

Statistical analyses were performed with IBM SPSS statistics 20 for Windows. Differences between the means of the two continuous variables were evaluated by the Student's *t*-test; Chi-square  $\chi^2$  test was used for categorical variables and to evaluate the genotype distribution and allele frequencies of the studied polymorphisms, and whether individual variants were in the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). Pearson correlation was used to search for possible associations between the different semen parameters and CAT activity. The difference in seminal concentration of CAT between the three genotype carriers was analyzed by oneway ANOVA basing on normality and the homogeneity of distribution of variances in the three groups using the Leven test ( $p = 0.691$ ). The association between male infertility and the studied genotypes was estimated based on an odds ratio (OR) and a 95% confidence interval (CI) using a multivariate logistic regression analysis. *P*-value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

#### Acknowledgments

The authors would like to acknowledge all volunteer patients and controls for their participation in this study; National Research Center in Biotechnology, Constantine, Algeria, for insuring the DNA extraction from all the blood samples, and CHU of Batna and Laboratory of El Farabi, Batna, Algeria, for their guidance and help in collecting semen samples and assistance in examining semen parameters.

#### Declaration of interest

This work has been partially supported by grant number 15/2016 for SM from the Deanship of Scientific Research and Higher Studies, Yarmouk University, Irbid, Jordan. The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

#### Notes on contributors

Designed the study, recruited subjects, performed experiments, and drafted paper: BNEH. Supported and directed the molecular part of the study and revised the paper: SM; Participated in the study design and revised the paper: MY; Helped in performing the experiments: AAAA. All authors approved the final paper.

## References

- Aebi, H. (1984) Catalase *in Vitro*. *Methods Enzymol* **105**: 121–126.
- Agarwal, A., Prabakaran, S.A., Said, T.M. (2005) Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* **26**: 654–660.
- Ahn, J., Gammon, M.D., Santella, R.M., Gaudet, M.M., Britton, J.A., Teitelbaum, S.L., et al. (2005) Associations between breast cancer risk and the catalase genotype, fruit and vegetable consumption, and supplement use. *Am J Epidemiol* **162**: 943–952.
- Aitken, R.J., Harkiss, D., Buckingham, D. (1993) Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil* **98**: 257–265.
- Al-Azzawie, H.F., Naeim, M., Saleman, E.D., (2014) Evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant status in seminal plasma of Iraqi Infertile Men. *Int J Adv Res* **2**: 158–167.
- Casp, C.B., She, J.-X., McCormack, W.T. (2002) Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. *Pigment Cell Res* **15**: 62–66.
- Ferlin, A., Arredi, B., Foresta, C. (2006) Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxcol* **22**: 133–141.
- Fernández, J.L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., et al. (2005) Halosperm\* is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* **84**: 860.
- Forsberg, L., Lyrenäs, L., Morgenstern, R., de Faire, U. (2001) A common functional CT substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radic Biol Med* **30**: 500–505.
- Gagnon, C., Iwasaki, A., De Lamirande, E., Kovalski, N. (1991) Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci* **637**: 436–444.
- Gavalas, N.G., Akhtar, S., Gawkrödger, D.J., Watson, P.F., Weetman, A.P., Kemp, E.H. (2006) Analysis of allelic variants in the catalase gene in patients with the skin depigmenting disorder vitiligo. *Biochem Biophys Res Commun* **345**: 1586–1591.
- Gibbons, N.C., Wood, J.M., Rokos, H., Schallreuter, K.U. (2006) Computer simulation of native epidermal enzyme structures in the presence and absence of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): potential and pitfalls. *J Invest Dermatol* **126**: 2576–2582.
- Goulas, A., Fidani, L., Kotsis, A., Mirtsou, V., Petersen, R.C., Tangalos, E., et al. (2002) An association study of a functional catalase gene polymorphism, -262C->T, and patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **330**: 210–213.
- Hammadeh, M.E., Al Hasani, S., Rosenbaum, P., Schmidt, W., Hammadeh, C.F. (2008) Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. *Arch Gynecol Obstet* **277**: 515–526.
- Ji, M., Tang, J., Zhao, J., Xu, B., Qin, J., Lu, J. (2012a) Polymorphisms in genes involved in drug detoxification and clinical outcomes of anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in Chinese Han breast cancer patients. *Cancer Biol Ther* **13**: 264–271.
- Ji, G., Gu, A., Wang, Y., Huang, C., Hu, F., Zhou, Y., et al. (2012b) Genetic variants in antioxidant genes are associated with sperm DNA damage and risk of male infertility in a Chinese population. *Free Radic Biol Med* **52**: 775–780.
- Kawakami, E., Takemura, A., Sakuma, M., Takano, M., Hirano, T., Hori, T., et al. (2007) Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. *J Vet Med Sci* **69**: 133–136.
- Khodayari, S., Salehi, Z., Fakhrieh Asl, S., Aminian, K., Mirzaei Gisomi, N., Torabi Dalivandan, S. (2013) Catalase gene C-262T polymorphism: Importance in ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* **28**: 819–822.
- Khosrowbeygi, A., Zarghami, N., Deldar, Y. (2004) Correlation between sperm quality parameters and seminal plasma antioxidants status. *Int J Reprod BioMed* **2**: 58–64.
- Kodydková, J., Vávrová, L., Kocik, M., Zak, A. (2014) Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol* **60**: 153–167.
- Komina, A.V., Korostileva, K.A., Gyrylova, S.N., Belonogov, R.N., Ruksha, T.G. (2012) Interaction between single nucleotide polymorphism in catalase gene and catalase activity under the conditions of oxidative stress. *Physiol Res* **61**: 655–658.
- Liu, L., Li, C., Gao, J., Li, K., Zhang, R., Wang, G., et al. (2010) Promoter variant in the catalase gene is associated with vitiligo in Chinese people. *J Invest Dermatol* **130**: 2647–2653.
- Macanovic, B., Vucetic, M., Jankovic, A., Stancic, A., Buzadzic, B., Garalejic, E., et al. (2015) Correlation between sperm parameters and protein expression of anti-oxidative defense enzymes in seminal plasma: a pilot study. *Dis Markers* **2015**: 436236.
- Mak, J.C.W., Ho, S.P., Yu, W.C., Choo, K.L., Chu, C.M., Yew, W.W., et al. (2007) Polymorphisms and functional activity in superoxide dismutase and catalase genes in smokers with COPD. *Eur Respir J* **30**: 684–690.
- Makker, K., Agarwal, A., Sharma, R. (2009) Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* **129**: 357–367.
- Nabil, H., Moemen, L.A., Elela, M.H.A. (2008) Studying the levels of malondialdehyde and antioxidant parameters in normal and abnormal human seminal plasma. *Aust J Basic Appl Sci* **2**: 773–778.
- Nadif, R., Mintz, M., Jedlicka, A., Bertrand, J.-P., Kleberger, S.R., Kauffmann, F. (2005) Association of CAT polymorphisms with catalase activity and exposure to environmental oxidative stimuli. *Free Radic Res* **39**: 1345–1350.
- Oliva, R. (2006) Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* **12**: 417–435.
- Perianayagam, M.C., Liangos, O., Kolyada, A.Y., Wald, R., MacKinnon, R.W., Li, L., et al. (2007) NADPH oxidase p22phox and catalase gene variants are associated with biomarkers of oxidative stress and adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **18**: 255–263.
- Plante, M., de Lamirande, E., Gagnon, C. (1994) Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril* **62**: 387–393.
- Ramya, T., Misro, M.M., Sinha, D., Nandan, D., Mithal, S. (2011) Altered levels of seminal nitric oxide, nitric oxide synthase, and enzymatic antioxidants and their association

- with sperm function in infertile subjects. *Fertil Steril* **95**: 135–140.
- Saadat, M., Safaie, S., Saadat, I. (2014) Genetic polymorphism of C-262T catalase and susceptibility to schizophrenia. *Maced J Med Sci* **7**: 74–77.
- Sabouhi, S., Salehi, Z., Bahadori, M.H., Mahdavi, M. (2015) Human catalase gene polymorphism (CAT C-262T) and risk of male infertility. *Andrologia* **47**: 97–101.
- Samant Parineeta, M., Badade Zunjarrao, G., Kate Madhuri, S., Deepak, A.D. (2009) Seminal Malondialdehyde Concentration and Superoxide Dismutase, CAT Activity In Male Infertility. *Internet J Health* **11**: 1–7.
- Sanocka, D., Miesel, R., Jedrzejczak, P., Chelmonska-Soyta, A., Kurpisz, M. (1997) Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility. *Int J Androl* **20**: 255–264.
- Schallreuter, K.U., Salem, M.A., Gibbons, N.C., Maitland, D. J., Marsch, E., Elwary, S.M., et al. (2012) Blunted epidermal l-tryptophan metabolism in vitiligo affects immune response and ROS scavenging by Fenton chemistry, part 2: epidermal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ONOO-mediated stress in vitiligo hampers indoleamine 2, 3-dioxygenase and aryl hydrocarbon receptor-mediated immune response signaling. *FASEB J* **26**: 2471–2485.
- Sharlip, I.D., Jarow, J.P., Belker, A.M., Lipshultz, L.I., Sigman, M., Thomas, A.J., et al. (2002) Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* **77**: 873–882.
- Tavilani, H., Goodarzi, M.T., Vaisi-Raygani, A., Salimi, S., Hassanzadeh, T. (2008) Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *Int Braz J Eurol* **34**: 485–491.
- Tremellen, K. (2008) Oxidative stress and male infertility a clinical perspective. *Hum Reprod Update* **14**: 243–258.
- Trussell, J.C. (2013) Optimal diagnosis and medical treatment of male infertility. *Semin Reprod Med* **31**: 235–236.
- WHO (2010) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5<sup>th</sup> edition, World Health Organization, Geneva.
- Zarbock, R., Hendig, D., Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C. (2007) Pseudoxanthoma elasticum: genetic variations in antioxidant genes are risk factors for early disease onset. *Clin Chem* **53**: 1734–1740.
- Zelen, I., Mitrović, M., Jurišić-Škevin, A., Arsenijević, S. (2010) Activity of superoxide dismutase and catalase and content of malondialdehyde in seminal plasma of infertile patients. *Med Pregl* **63**: 624–629.
- Zini, A., Garrels, K., Phang, D. (2000) Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology* **55**: 922–926.

## Résumé

L'infertilité masculine idiopathique est devenue un vrai problème de santé publique. Récemment, une grande attention est attribuée à l'implication des facteurs génétiques et du stress oxydatif dans cette pathologie. Dans le but d'établir une association entre le statut oxydatif séminal et les paramètres spermatiques, de rechercher un effet possible des polymorphismes *CAT-262 C/T* et *SOD3 362G/A* sur les activités enzymatiques concernées et sur le risque de l'infertilité masculine idiopathique, nous avons réalisé, sur une période allant de Mars 2013 au Mai 2016, une étude portée sur 168 hommes infertiles et 131 témoins fertiles de la région de Batna. Les paramètres spermatiques standards, la fragmentation de l'ADN, les activités de SOD, GPX, CAT et les taux de MDA dans le plasma séminal ont été évalués, par des méthodes spectrophotométriques. Le polymorphisme *CAT-262C/T* a été criblé en utilisant une PCR d'allèle spécifique et le *SOD3 362G/A* en utilisant PCR-RFLP.

Nos résultats montrent que les activités séminales de SOD, CAT et GPX étaient significativement inférieures ( $P < 0,001$ ) chez les malades par rapport aux témoins, elles étaient également atténuées dans la majorité des sous-groupes infertiles. Parallèlement, Nous avons noté que le taux de MDA séminal des hommes infertiles est supérieur à celui des témoins ( $1,795 \pm 0,607$  nmol/mL vs  $1,620 \pm 0,533$  nmol / mL,  $P=0,007$ ). Des corrélations positives entre les activités enzymatiques, les paramètres spermatiques et la fragmentation de l'ADN ont été détectées. Le MDA a été exclusivement corrélé avec la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Nous n'avons trouvé aucune association entre les polymorphismes *CAT-262C/T* et *SOD3 362G/A* et le risque de l'infertilité masculine ( $P > 0,5$ ). Cependant, Nous avons montré pour la première fois l'effet délétère de l'allèle mutant *CAT-262T* sur l'activité séminale de CAT.

**Mots clés:** Infertilité masculine, Paramètres spermiologiques, Superoxyde dismutase, Catalase, Glutathion peroxydase, Malondialdéhyde, *CAT-262C/T*, *SOD3 362G/A*.

## Abstract

Idiopathic male infertility has become a real public health problem. Recently, a big attention has been paid to the implication of genetic factors and oxidative stress in this pathology. In order to establish an association between the seminal oxidative status and semen parameters, to search for a possible effect of the *CAT-262 C/T* and *SOD3 362G/A* polymorphisms on the related enzymatic activities and on the risk of idiopathic male infertility, we conducted a study on 168 infertile men and 131 fertile controls from the region of Batna, that extended from March 2013 to May 2016. Standard sperm parameters, DNA fragmentation, activities of SOD, GPX, CAT and MDA levels in seminal plasma were evaluated using spectrophotometric analysis. The *CAT-262C/T* polymorphism was screened using allele specific PCR and the *SOD3 362G/A* using PCR-RFLP.

Our results show that Seminal c activities of SOD, CAT and GPX were significantly decreased ( $P < 0.001$ ) in patients compared to controls, they were also attenuated in the majority of infertile subgroups. At the same time, we noted that the rate of seminal MDA of infertile men is higher than that of controls ( $1.795 \pm 0.607$  nmol/mL vs  $1.620 \pm 0.533$  nmol/mL,  $P= 0.007$ ). Positive correlations between enzymatic activities, sperm parameters and DNA fragmentation were detected. MDA was exclusively correlated with fragmentation of sperm DNA. We found no association between *CAT-262C/T* and *SOD3 362G/A* polymorphisms and the risk of male infertility ( $P > 0.5$ ). However, we showed for the first time the deleterious effect of the *CAT-262T* mutant allele on seminal CAT activity.

**Key words:** Male infertility. Semen parameters. Superoxide dismutase. Catalase. Glutathione peroxidase. Malondialdehyde. *CAT-262C/T*. *SOD3 362G/A*.

## ملخص

أصبح عقم الذكور مجهول السبب مشكلة صحية عامة حقيقية. في الآونة الأخيرة، تم إيلاء اهتمام كبير لتأثير العوامل الوراثية والإجهاد التأكسدي في هذه الأمراض. من أجل إنشاء علاقة بين الحالة التأكسدية المنوية ومعلومات السائل المنوي، للبحث عن تأثير محتمل لتعدد الأشكال ل *CAT-262 C/T* و *SOD3 362G/A* على الأنشطة الأنزيمية ذات الصلة وعلى خطر عقم الذكور مجهول السبب، أجرينا دراسة عن 168 من الرجال المصابين بالعقم و 131 من الرجال الأصحاء من منطقة باتنة. الدراسة امتدت من مارس 2013 إلى مايو 2016. وتم تقييم المعلومات القياسية للحيوانات المنوية ودراسة تجزئة الحمض النووي وأنشطة SOD, GPX, CAT وMDA في البلازما المنوية باستخدام تحليل الطيف الضوئي. تم فحص تعدد الأشكال *CAT-262C/T* باستخدام AS-PCR و *SOD3 362G/A* باستخدام PCR-RFLP.

أظهرت نتائجنا ان الأنشطة المنوية من ال SOD, CAT GPX قد انخفضت معنويا ( $P > 0.001$ ) في المرضى مقارنة بالضوابط، كما لوحظ نقصها في غالبية المجموعات الفرعية من العقم. في الوقت نفسه، لاحظنا أن معدل MDA المنوي للرجال الذين يعانون من العقم أعلى من الكمية الملاحظة عند الأصحاء ( $1.795 \pm 0.607$  نانومول / مل مقابل  $1.620 \pm 0.533$  نانومول / مل،  $P = 0.007$ ). تم الكشف عن الارتباطات الإيجابية بين الأنشطة الأنزيمية، المعلومات الحيوانية المنوية وتجزئة الحمض النووي. لكن MDA يرتبط حصرا مع تجزئة الحمض النووي للحيوانات المنوية. لم نجد أي ارتباط بين *CAT* تعدد الأشكال الجينية *CAT-262C/T* و *SOD3 362G/A* وخطر العقم عند الذكور ( $P < 0.5$ ). ومع ذلك، أظهرنا لأول مرة التأثير الضار للأليل الطافر *CAT-262T* على نشاط *CAT* في السائل المنوي.

الكلمات الدالة: عقم الذكور. معلومات السائل المنوي. SOD. CAT. GPX. MDA. *CAT-262C/T*. *SOD3362G/A*.