

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR**  
**ET DE LARECHERCHE SCIENTIFIQUE**

Université Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 39/DS/2013  
N° de série : 04/BA/2013

**THÈSE**

Présentée pour l'obtention du diplôme de docteur en sciences

Option : Génétique des pathologies humaines

Par

**REZGOUNE-CHELLAT DJALILA**

THÈME :

**Étude cytogénétique et moléculaire  
des infertilités masculines**

**Membres du Jury :**

<b>Président du Jury</b>	<i>BENLATRECHE C</i>	<i>Prof. Université Constantine 3</i>
<b>Directrice de thèse</b>	<i>SATTA D</i>	<i>Prof. Université Constantine 1</i>
<b>Examineurs</b>	<i>MC ELREAVEY K</i>	<i>Prof. Institut Pasteur, Paris</i>
	<i>ABADI N</i>	<i>Prof. Université Constantine 3</i>
	<i>BOURAS M</i>	<i>M.C. Université de Batna</i>
	<i>TOUABTI S</i>	<i>Prof. Université de Sétif</i>

Année universitaire: 2012 - 2013

# *Remerciements et dédicaces*

*À mon époux,*

*À mon père et ma mère,*

*À ma belle-mère,*

*À Abdelkader et sa femme,*

*À Zouleikha et son marie,*

*À mon petit frère Zakaria,*

*À ma petite sœur Asma.*

**AU TOUT PUISSANT ALLAH :**

*Merci de m'avoir tenu en bonne santé pour la réalisation de cette  
thèse.*

*Merci de m'avoir donné la force et le courage d'entreprendre ce  
travail.*

*Que gloire et louanges vous soient consacrées pour l'éternité.*

## REMERCIEMENTS

*Après un peu plus de cinq années maintenant, cette thèse a fini par aboutir. Ce ne fut pas une mince affaire et les obstacles furent multiples, et si j'ai su les franchir (parfois les contourner) c'est avant tout grâce à un grand nombre de personnes auxquelles je voudrais exprimer mes remerciements*

*En premier lieu, je tiens à remercier très sincèrement madame le professeur **SATTA D**, ma directrice de thèse.*

*Par sa disponibilité, sa gentillesse et le degré d'humanisme dont elle fait preuve, elle s'est impliquée avec enthousiasme et esprit de responsabilité à tous les niveaux de conception des travaux de recherche qui ont abouti à la rédaction de cette thèse. Veuillez trouver ici, madame, l'expression de ma profonde gratitude et de l'estime que je porte pour vous.*

*Je remercie sincèrement monsieur le professeur **MC ELREAVEY K**, directeur de l'unité de recherche « Human Developmental Genetics », pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de collaborer à ce travail mais également pour la confiance dont il m'honore. Son dynamisme et sa disponibilité m'ont beaucoup apporté. Je ne saurais assez dire l'honneur et le plaisir de travailler à ses côtés.*

*Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.*

*Je suis profondément reconnaissante à madame le professeur **BENLATRECHE C** et monsieur le professeur **ABADI N**, qui m'ont ouvert les portes et mis à ma disposition, sans compter, tous les moyens disponibles pour la réalisation de ce travail. La confiance qu'ils ont bien voulu m'accorder en m'accueillant dans leurs laboratoires. Ainsi que leurs encouragements furent très précieux...*

*Je ne saurais dire combien la perspective de la poursuite de cette collaboration me réjouit.*

*Pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter de siéger dans le jury de cette thèse, je tiens à remercier*

*Le professeur **BENLATRECHE C***

*Le Professeur **MC ELREAVEY K***

*Le professeur **ABADI N***

*Le professeur **TOUABTI S***

*Le docteur **BOURAS M***

*Je tiens à remercier le personnel du laboratoire de biologie et génétique moléculaire du CHU, et en particulier **DADCI Y, BOULEKROUNE Z, BENKHEIREDDINE M, BRIHMET A, BOUCHAREB M ET SIHEM** pour s'être impliqués dans ce travail.*

*Je tiens également à remercier madame **BIGNON-TOPALOVIC J** pour sa gentillesse, son enthousiasme et ses conseils très efficaces.*

## **DEDICACES**

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

*À mon époux **MOHAMED LARBI**, un énorme merci pour ta patience, ton écoute, tes conseils et ta présence tout au long de cette thèse. Sans toi, elle n'aurait pu voir le jour ; sans toi, je n'aurais pas tenu. Je n'aurai jamais assez de ces quelques lignes dans ce manuscrit pour te remercier pour ton amour. Je crois savoir que tu es content que tout cela s'achève enfin, car maintenant de nouvelles aventures s'annoncent pour nous... De tout mon cœur, je t'aime.*

*À **ma mère**, qui m'a tant et tant donné et m'a si bien accompagnée tout au long de mes études. Merci maman.*

*À **Papa**, un papa merveilleux qui est toujours là quand j'en ai besoin et se met en quatre s'il le faut. Quelques lignes ne suffissent pas à faire une longue et belle phrase digne de toi alors juste **MERCI**, pour tout.*

*À **ma belle-mère**, qui m'a accueillie si chaleureusement et dont le soutien est constant.*

*À mes très chères sœurs **Zouzou** et **Mimi** : Votre soutien moral me restera toujours en mémoire. Je vous souhaite beaucoup de succès dans votre vie et surtout beaucoup de joie et de bonheur.*

*À mes deux chers frères :*

**KADER** : *merci pour tes encouragements et surtout pour ta patience pendant la période de recrutement des patients*

**ZAKI** : *Merci pour tous les moments de complicité que nous avons passé ensemble et surtout pour ta sagesse qui dépasse ton âge.*

*À ma belle-sœur ASSIA, merci d'être présente*

*À mon gentil beau-frère YUCEF*

*À mes oncles et tantes ; votre soutien et vos bénédictions m'ont sûrement éclairé dans cette aventure. Recevez cet humble travail, preuve de ma respectueuse admiration et de ma sincère reconnaissance.*

*À mes cousins et cousines ; Que ce travail fasse votre fierté.*

*À toute ma famille qui m'a toujours soutenue.*

*À mes amis,*

*Ma très chère bien aimée NAOUEL avec toi j'ai passée de très beaux moments, merci pour tout.*

**À CHAHINEZ, HADIA, RAZIKA, SOUAD, WARDA, WISSEM ET ZINEB**

*Ces années de thèse ont été riches en émotions et en rencontres, tant sur le plan professionnel que personnel. Durant cette période, j'ai rencontré des personnes formidables. Un grand Merci.*

*À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail, et que j'aurais oublié de citer.*

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>Ad4BP</b>	Adrenal 4-Binding Protein
<b>ABCD</b>	Absence Bilatérale des Canaux Déférents
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>AF</b>	Activation Function
<b>AMP</b>	Assistance Médicale à la Procréation
<b>AO</b>	Azoospermie Obstructive
<b>AZF</b>	AZoospermia Factor
<b>BET</b>	Bromure d'ETidium
<b>BPY1-2</b>	Basic Proteins Y1 et Y2
<b>CAT</b>	CATalase
<b>CDY</b>	Chromo Domain Y
<b>CFTR</b>	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
<b>CRE</b>	cAMP Response Element
<b>CREB</b>	CRE-Binding Protein
<b>DAZ</b>	Deleted in AZoospermia
<b>DBD</b>	DNA Binding Domain
<b>DBY</b>	Dead Box Y
<b>DDX3Y</b>	Dead-box (Asp-Glu-Ala-Asp) protein 3 Y chromosomal
<b>DFFRY</b>	Drosophila Fat-Facets Related Y
<b>DSD</b>	Disorder of Sex Development
<b>eIF1AY</b>	eukaryotic translation-Initiation Factor 1A Y isoform
<b>ER</b>	Estrogen Receptor
<b>ERE</b>	Estrogen Response Element
<b>FISH</b>	Fluorescente In Situ Hybridization
<b>FSH</b>	Follicle Stimulating Hormone
<b>FTHL17</b>	Ferritin Heavy polypeptide-Like 17
<b>FSHR</b>	Follicle Stimulating Hormone Receptor
<b>GnRH</b>	Gonadotropin Releasing Hormone
<b>GPX1</b>	Glutathione Peroxidase 1
<b>H19</b>	Imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)
<b>HERV</b>	Human Endogenous RetroViruses
<b>HMG</b>	High Mobility Group

<b>HORMAD1</b>	HORMA Domain containing
<b>HRAS</b>	Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog
<b>HSF2</b>	Heat Shock transcription Factor 2
<b>HSFY</b>	Heat Shock Factor Y chromosome
<b>HSP</b>	Heat Shock Protein
<b>ICSI</b>	Intra-Cytoplasmic Sperm Injection
<b>Idic(Y)</b>	Isodicentric Y Chromosome
<b>IGF2</b>	Insulin-like Growth Factor 2
<b>InsI3</b>	Insuline-like factor 3
<b>KCNQ1</b>	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1
<b>LBD</b>	Ligand Binding Domain
<b>LH</b>	Luteinizing Hormone
<b>LINE1</b>	Long Interspersed Nuclear Elements 1
<b>MEST</b>	Mesoderm Specific Transcript
<b>MSY</b>	Male Specific region of the Y
<b>MTHFR</b>	Méthylène Tétra Hydro Folate Réductase
<b>NOA</b>	Non Obstructive Azoospermia
<b>NR5A1</b>	Nuclear Receptor subfamily 5, group A, membre 1
<b>NQO1</b>	NAD(P)H dehydrogenase, Quinone 1
<b>NRY</b>	Non-Recombining region of Y chromosome
<b>NTF3</b>	Neurotrophin 3
<b>OAT</b>	Oligo-Asthéno-Tératozoospermie
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>PAR 1 et 2</b>	Pseudo-Autosomal Region 1 et 2
<b>PAX 8 :</b>	PAired boX 8
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PGC</b>	Primordial Germinal Cells
<b>PLAG1</b>	PLeiomorphic Adenoma Gene 1
<b>POLG</b>	ADN Polymérase $\gamma$
<b>PON1</b>	Paraoxonase 1
<b>PRL</b>	Prolactine
<b>PRY</b>	PTPN13-like, Y-linked

<b>r(Y)</b>	Ring Y Chromosome
<b>RASGRF1</b>	Ras protein-specific Guanine nucleotide-Releasing Factor 1
<b>RBM</b>	RNA Binding Motif
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RLF</b>	Relaxine-Like Factor
<b>RXFP2</b>	Relaxin/insulin-like Family Peptide receptor 2
<b>SCF</b>	Stem Cell Factor
<b>NFX2</b>	Nuclear transcription Factor, X-box binding 2
<b>SCO</b>	Sertoli Cell Only syndrome
<b>SF1</b>	Steroidogenic Factor 1
<b>SINE</b>	Short Interspersed Nuclear Element
<b>SK</b>	Syndrome de Klinefelter
<b>SMCY</b>	Selected Mouse Complementary DNA on the Y chromosome
<b>SNP</b>	Single Nucleotid Polymorphism
<b>TEX13A/B</b>	Testis EXpressed gene 13
<b>SNRPN</b>	Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N
<b>SOD2</b>	Super-Oxide Dismutase 2, mitochondrial
<b>SOD3</b>	Super-Oxide Dismutase 3, extracellular
<b>SRY</b>	Sex-determining Region on Y chromosome
<b>FMR1</b>	Fragile X Mental Retardation 1
<b>STS</b>	Sequence Tagged Site
<b>TBE</b>	Tris Borate EDTA
<b>TAF7L</b>	TAF7-like RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor)
<b>TDF</b>	Testis Determining Factor
<b>TDS</b>	Testicular Dysgenesis Syndrome
<b>TKTL1</b>	TransKeTolase-Like 1
<b>USP9Y</b>	Ubiquitin Specific Protease 9 Y chromosome
<b>USP26</b>	Ubiquitin Specific Peptidase 26
<b>UTY</b>	Ubiquitous Tetratricopeptide repeat motif Y
<b>XKRY</b>	XK Related Y
<b>Yqs</b>	satellite du bras long du chromosome Y

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b>	Déroulement de la spermatogenèse.	<b>3</b>
<b>Figure 2 :</b>	Structure sagittale du testicule humain.	<b>4</b>
<b>Figure 3 :</b>	Structure transversale partielle d'un testicule humain adulte.	<b>5</b>
<b>Figure 4 :</b>	Les spermatogonies et leur renouvellement.	<b>6</b>
<b>Figure 5 :</b>	Schéma des différentes composantes de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire.	<b>8</b>
<b>Figure 6 :</b>	Schéma de la structure globale du chromosome Y montrant les deux régions PAR encadrant la partie MSY.	<b>19</b>
<b>Figure 7 :</b>	Répartition des trois classes de séquence de l'euchromatine du chromosome Y	<b>20</b>
<b>Figure 8 :</b>	Représentation schématique des gènes et des régions AZF du chromosome Y humain.	<b>21</b>
<b>Figure 9 :</b>	Structure du gène et de la protéine SF-1.	<b>27</b>
<b>Figure 10 :</b>	Polymorphisme CAG du premier exon du gène du récepteur aux androgènes.	<b>29</b>
<b>Figure 11 :</b>	Caryogramme 46,XY en bandes G (résolution 400 bandes).	<b>38</b>
<b>Figure 12 :</b>	Caryogramme 46,XY en bandes R (résolution 400 bandes).	<b>38</b>
<b>Figure 13 :</b>	Schémas des deux types de nucléotides triphosphates.	<b>45</b>
<b>Figure 14 :</b>	Chromosomes métaphasiques d'un noyau cellulaire (1) éclaté et dispersé. Grossissement X 100.	<b>53</b>
<b>Figure 15 :</b>	Caryotype masculin normal 46,XY (RHG).	<b>53</b>
<b>Figure 16 :</b>	Chromosomes métaphasiques d'un noyau cellulaire (2) éclaté et dispersé. Grossissement X 100.	<b>54</b>
<b>Figure 17 :</b>	Caryotype masculin anormal 47,XXY (coloration simple).	<b>54</b>
<b>Figure 18 :</b>	Chromosomes métaphasiques de deux noyaux cellulaires (3) éclatés et dispersés. Grossissement X 100	<b>55</b>
<b>Figure 19 :</b>	Caryotype masculin anormal en mosaïque 46,XY/47,XXY (coloration simple)	<b>55</b>
<b>Figure 20 :</b>	Chromosomes métaphasiques de deux noyaux cellulaires (4) éclatés et dispersés. Grossissement X 100.	<b>56</b>
<b>Figure 21 :</b>	Caryotype masculin anormal en mosaïque 46,XY/47,XYY (coloration simple)	<b>56</b>
<b>Figure 22 :</b>	Chromosomes métaphasiques d'un noyau cellulaire (5) éclaté et dispersé. Grossissement X 100.	<b>57</b>
<b>Figure 23 :</b>	Caryotype d'un homme 46, XX (GTG).	<b>57</b>

- Figure 24 :** Photographie du profil électrophorétique du patient azoospermique (8) avec une délétion de la région AZFc et du patient (9) (SRY négatif). **59**
- Figure 25 :** Les résultats du génotypage C677T de la MTHFR. **60**
- Figure 26 :** Exemple de profil de séquençage obtenu (mutation Val83Gly, double pic évident pour le G4 dans l'exon 2 du gène NR5A1) **63**
- Figure 27 :** Distribution des Mutations de NR5A1 associées à une spermatogenèse défectueuse. **63**

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b>	Paramètres spermatiques normaux définis selon les critères de l’OMS.	11
<b>Tableau 2 :</b>	Séquences des amorces utilisées pour la recherche de microdélétions du chromosome Y et conditions d’amplification.	40
<b>Tableau 3 :</b>	Composants du mélange réactionnel de PCR pour la région AZF	42
<b>Tableau 4 :</b>	Composants du mélange réactionnel de PCR pour la MTHFR.	43
<b>Tableau 5 :</b>	Programme d’amplification PCR de la MTHFR.	43
<b>Tableau 6 :</b>	Composants du mélange de la digestion.	44
<b>Tableau 7 :</b>	Génotypage de la MTHFR.	44
<b>Tableau 8 :</b>	Mélange réactionnel pour la PCR du gène NR5A1.	45
<b>Tableau 9 :</b>	Séquences d'amorces et conditions d'amplification des exons du gène NR5A1.	46
<b>Tableau 10 :</b>	Purification du fragment amplifié.	47
<b>Tableau 11 :</b>	Marquage du produit de PCR purifié.	47
<b>Tableau 12 :</b>	Tableau de contingence.	48
<b>Tableau 13 :</b>	Classification des patients selon les concentrations spermatiques.	49
<b>Tableau 14 :</b>	Classification des patients en fonction de l’origine géographique.	49
<b>Tableau 15 :</b>	Répartition des patients par tranche d’âge.	50
<b>Tableau 16 :</b>	Comparaison des différents paramètres spermatiques chez les patients fertiles et infertiles.	50
<b>Tableau 17 :</b>	Valeurs hormonales des hommes fertiles et infertiles.	51
<b>Tableau 18 :</b>	Différents types d’aberrations chromosomiques retrouvées chez les 80 patients infertiles étudiés	52
<b>Tableau 19 :</b>	Répartition des génotypes de la MTHFR C677T chez les infertiles (n = 74) et les témoins (n = 84).	60
<b>Tableau 20 :</b>	Fréquences génotypiques du polymorphisme C677T de la MTHFR selon le type d’infertilité.	61
<b>Tableau 21 :</b>	Mutations et polymorphismes NR5A1 et phénotypes associés.	62
<b>Tableau 22 :</b>	Résultats des mutations et des polymorphismes du gène NR5A1.	62

# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ET DÉDICACES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

1

## I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>1. La spermatogenèse.....</b>	<b>3</b>
1.1 Structure et fonctions du testicule humain.....	4
1.2 Les phases de la spermatogenèse.....	6
1.3 Contrôle neuro-endocrinien de la fonction testiculaire.....	7
<b>2. L'infertilité masculine.....</b>	<b>10</b>
2.1 Paramètres spermatiques.....	10
2.2 Étiologie .....	11
2.3 Exploration de l'infertilité masculine.....	12
2.4 Caryotype et infertilité masculine.....	13
2.5 Chromosome Y et infertilité masculine.....	18
2.6 Mutations géniques et infertilité masculine.....	24
2.5 Polymorphisme génétique et infertilité masculine.....	28
2.6 Épigenétique et infertilité masculine.....	32

## II. MÉTHODOLOGIE

<b>1. Patients et témoins.....</b>	<b>35</b>
1.1 Recrutement des patients.....	35
1.2 Recrutement des témoins .....	35
<b>2. Méthodes.....</b>	<b>36</b>
2.1 Analyse hormonale.....	36
2.2 Étude cytogénétique.....	36
2.3 Étude moléculaire.....	39
2.4 Analyse statistique .....	47

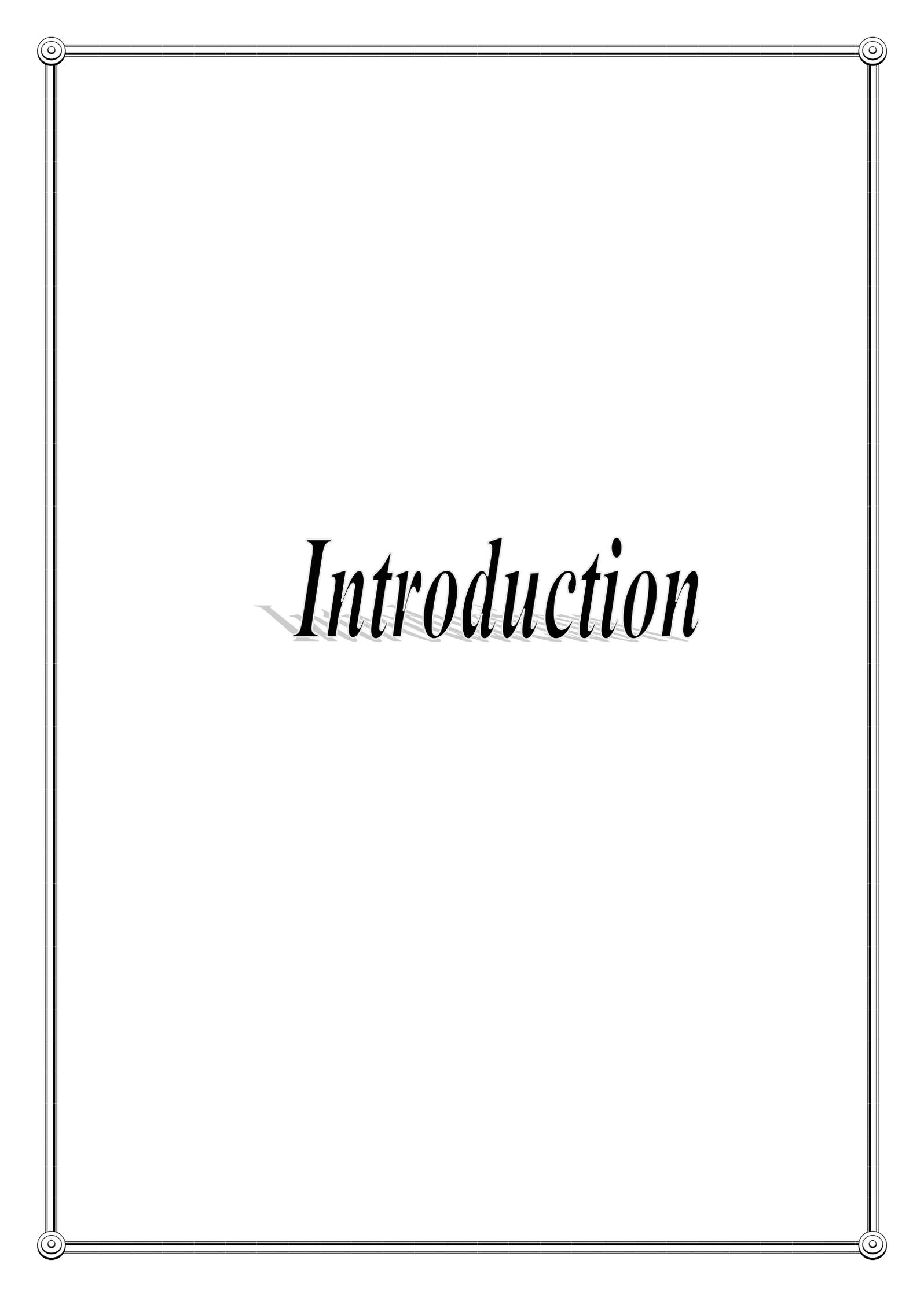
### **III. RÉSULTATS**

<b>1. Caractéristiques principales des patients.....</b>	<b>49</b>
<b>2. Résultats des analyses spermatiques et hormonales .....</b>	<b>50</b>
2.1 L'analyse spermatique.....	50
2.2 L'analyse hormonale.....	51
<b>3. Résultats de l'analyse cytogénétique .....</b>	<b>51</b>
3.1 Caryotype normal.....	53
3.2 Syndrome de klinefelter libre et homogène.....	54
3.3 Syndrome de klinefelter en mosaïque.....	55
3.4 Syndrome de mâle 47,XYX en mosaïque.....	56
3.5 Syndrome du mâle 46,XX.....	57
<b>4. Résultats de l'analyse moléculaire.....</b>	<b>58</b>
4.1 Microdélétions du chromosome Y.....	58
4.2 Polymorphisme C677T de la MTHFR.....	59
4.3 Séquençage du gène NR5A1.....	61
<b>IV. DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>64</b>
<b>V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>77</b>

### **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

### **ANNEXES**

### **RÉSUMÉS**



# *Introduction*

L'expansion de la population mondiale suggère que, globalement, les fonctions de reproduction de l'homme soient extrêmement correctes. Cependant, les échecs en matière de reproduction, des anomalies pendant la grossesse, et les malformations congénitales restent courantes et sont une dépense médicale et émotionnelle importantes pour la famille et la société.

Jusqu'à un sur sept couples (14%) éprouvent des difficultés à concevoir et, dans 30% à 50% des cas, le problème a été attribué à l'homme (Bashamboo *et al*, 2010). En Afrique ce pourcentage est de 12 à 21% (Gam, 2002).

L'infertilité est classiquement définie comme un état dans lequel un couple désirant un enfant est incapable de concevoir après 12 mois ou plus de rapports sexuels réguliers et non protégés. On parle d'infertilité primaire s'il n'y a jamais eu de grossesses, et d'infertilité secondaire si elle a eu lieu après une grossesse ou plus (Geidam *et al*, 2008).

L'infertilité masculine peut être expliquée par des problèmes hormonaux, immunologiques, d'acheminement de sperme, environnementaux et de la structure physique des organes reproducteurs. Toutefois, dans un certain nombre de cas, la cause de l'infertilité est inconnue en raison du manque de connaissance des mécanismes génétiques et moléculaires qui jouent un rôle dans le contrôle de la production de spermatozoïdes et leur maturation (Cameron, 2006).

L'infertilité masculine peut être classée en 3 groupes principaux :

- non obstructive (60%) : qui se définit par une production insuffisante de spermatozoïdes par les testicules.
- obstructive (38%) : la production de spermatozoïdes est normale mais il y a un blocage dans le tractus génital.
- coïtal (2%) : la production de spermatozoïdes est normale ainsi que les voies génitales, mais l'infertilité est secondaire à une dysfonction sexuelle (Abdel Raheem *et al*, 2012).

Une évaluation de la fertilité chez les hommes est basée sur la concentration des spermatozoïdes dans le sperme. La production correcte de ces cellules (spermatozoïdes) a été attribuée à plus de 1666 gènes (Zhang *et al*, 2013). Un défaut dans l'un de ces gènes peut affecter le développement des cellules germinales. L'identification de gènes responsables, leurs variations (Mutations et

polymorphismes) ainsi que les phénotypes associés représente une étape importante dans la prévention, le diagnostic et le traitement des maladies.

Des anomalies génétiques sont impliquées dans environ 30% de l'ensemble des infertilités masculines, dont un grand nombre se manifestent sous la forme de mutations génétiques affectant la spermatogenèse (Cameron, 2006). Elles peuvent être classées en trois groupes :

- Le premier groupe concerne les anomalies chromosomiques et plus particulièrement les aneuploïdies qui peuvent être trouvées chez 14% des patients azoospermiques et 3% des patients oligozoospermiques (Cameron, 2006).

- Le second groupe d'anomalies génomiques concerne la présence de délétions submicroscopiques ou "microdélétions" qui sont des suppressions de groupes de gènes sur le chromosome Y impliquées dans la spermatogenèse.

- Troisièmement, des mutations ponctuelles dans un gène unique peuvent conduire à un défaut spermatogénique sévère. Récemment, il a été démontré que des mutations affectant le gène NR5A1 peuvent expliquer certains cas d'infertilité idiopathique (Bashamboo *et al*, 2010).

### **L'objectif général de notre travail de thèse :**

- Appliquer les techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire pour mettre en évidence les éventuelles mutations responsables des infertilités masculines en Algérie.

### **Objectifs spécifiques :**

- Réaliser les analyses de cytogénétiques conventionnelles, par le caryotypage en bandes G et en bandes R.

- Explorer le génome somatique chez des hommes présentant des anomalies sévères de la spermatogenèse par l'étude de certains gènes impliqués (AZF, MTHFR).

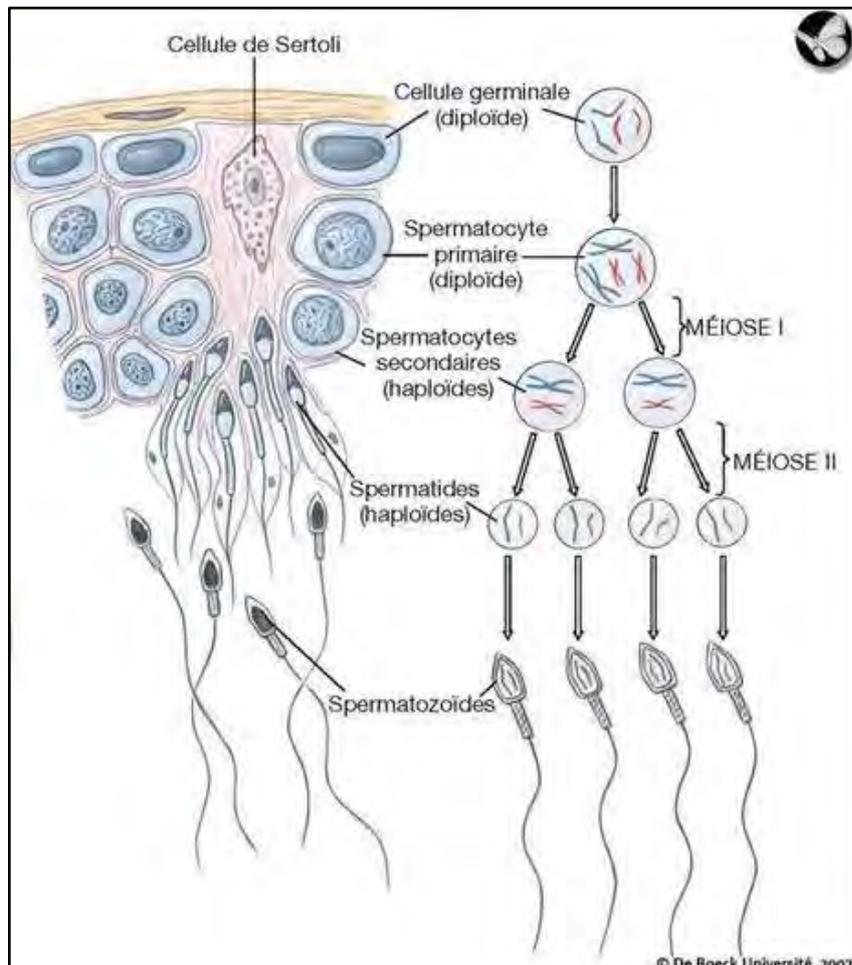
- Apprendre et appliquer la technique de séquençage afin d'identifier d'éventuelles mutations au niveau du gène NR5A1.

# *Étude bibliographique*

## 1. La spermatogenèse

La spermatogenèse (ou gamétogenèse mâle) est un processus complexe et hautement coordonné dans lequel les spermatogonies ( $2n$ ) diploïdes se différencient en spermatozoïdes haploïdes ( $1n$ ) matures dans l'épithélium séminifère (Figure 1). Dans ce processus, les spermatogonies subissent plusieurs divisions mitotiques et entrent dans une voie de renouvellement des cellules souches, ou s'engagent elles-mêmes pour un développement ultérieur. Les spermatocytes diploïdes subissent par la suite deux divisions méiotiques et le résultat est la production de spermatides rondes haploïdes. Ces derniers entament le processus de la spermiogénèse pour donner lieu à des spermatozoïdes féconds (Wing-Yee et Yan Cheng, 2008).

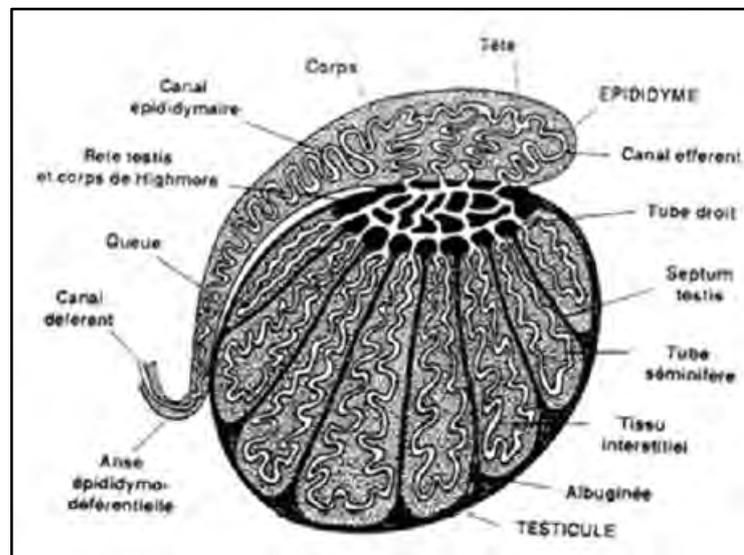
La spermatogenèse dure environ 74 jours et est permanente.



**Figure 1** : Déroulement de la spermatogenèse (Raven *et al*, 2007).

### 1.1 Structure et fonctions du testicule humain

Les testicules sont des organes pairs situés à l'intérieur du scrotum. Chez l'homme adulte, chaque testicule est une masse ovoïde qui mesure environ 5 cm de long, 3 cm de large et 2,5 cm d'épaisseur, entourée d'une enveloppe conjonctive, l'albuginée. Au pôle supérieur du testicule, il existe un épaississement conjonctif appelé le corps de Highmore. Celui-ci est relié à l'albuginée par des cloisons radiaires, les septatestis, qui délimitent 200 à 300 lobules testiculaires. Chaque lobule contient 2 ou 3 tubes séminifères mesurant 30 à 150 cm de long pour un diamètre de 150 à 300  $\mu\text{m}$  (Figure 2).



**Figure 2 :** Structure sagittale du testicule humain(Czyba et Montella, 1993).

Les tubes séminifères, sont constitués de cellules de la lignée germinale en cours de spermatogenèse, et de cellules somatiques qui ne se divisent pas, les cellules de Sertoli. Entre les tubes séminifères, les espaces interstitiels sont remplis d'un tissu conjonctif lâche, riche en capillaires sanguins et lymphatiques. Au contact des capillaires sont situées les cellules de Leydig (Figure 3), dont l'ensemble constitue la glande interstitielle du testicule. Les tubes séminifères déversent leur sécrétion dans les tubes droits, qui débouchent dans le rete testis, puis dans l'épididyme qui coiffe chacun des testicules et qui se poursuit par le canal déférent (Faure, 2007).



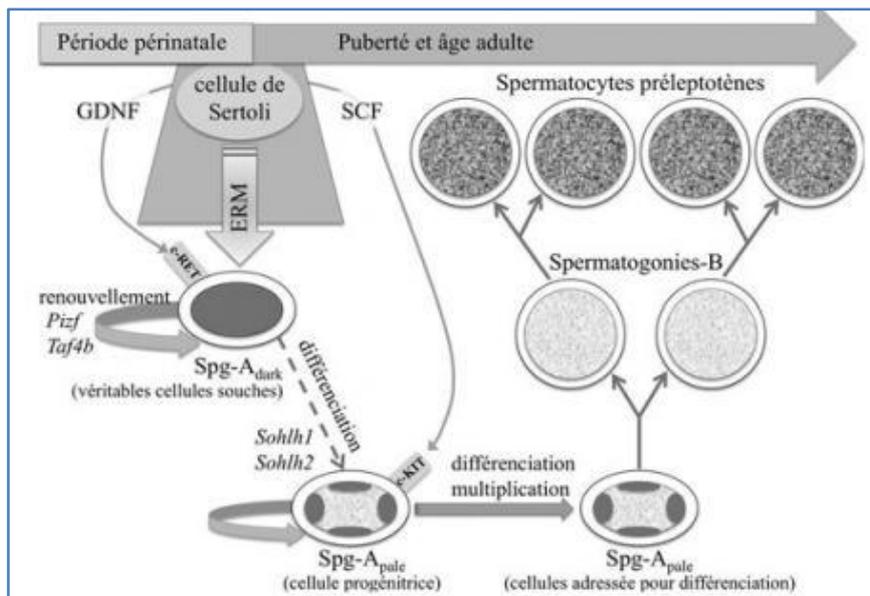
- le tissu interstitiel, conjonctif vascularisé, contenant les cellules de Leydig responsables de la production de la testostérone ;
- les tubes séminifères, de nature épithéliale, avasculaires, contenant les cellules germinales et les cellules de Sertoli qui servent de support à la spermatogenèse.

## 1.2 Les phases de la spermatogenèse

### 1.2.1 La mitose

La division mitotique aboutit à la production de spermatogonies dont certaines se différencient en spermatocytes de premier ordre (spermatocytes I)(Hess et Renato de Franka, 2008).

Chez l'homme, les spermatogonies peuvent être séparées en trois groupes selon les caractères de leur noyau. On distingue les cellules de type A sombres (Ad), les cellules de type A pâles (Ap) et les cellules de type B. Les spermatogonies de type Ad seraient les vraies cellules souches de la spermatogenèse, donnant naissance par mitose à d'autres spermatogonies Ad et à quelques spermatogonies Ap, lesquelles, à leur tour, se divisent par mitose pour constituer des amas de cellules filles reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques. Ces spermatogonies Ap se différencient ensuite en spermatogonies de type B qui se multiplient par mitose puis se différencient en amas pour former des spermatocytes I (Figure 4).



**Figure 4 :** Les spermatogonies et leur renouvellement (PonceletetSifer, 2011).

### **1.2.2 La méiose**

Les spermatocytes I répliquent leur ADN peu après leur formation et subissent une longue prophase, de 22 jours environ, pendant laquelle les modifications de la chromatine nucléaire permettent d'identifier les stades pré-leptotène, leptotène, zygotène, pachytène et diplotène.

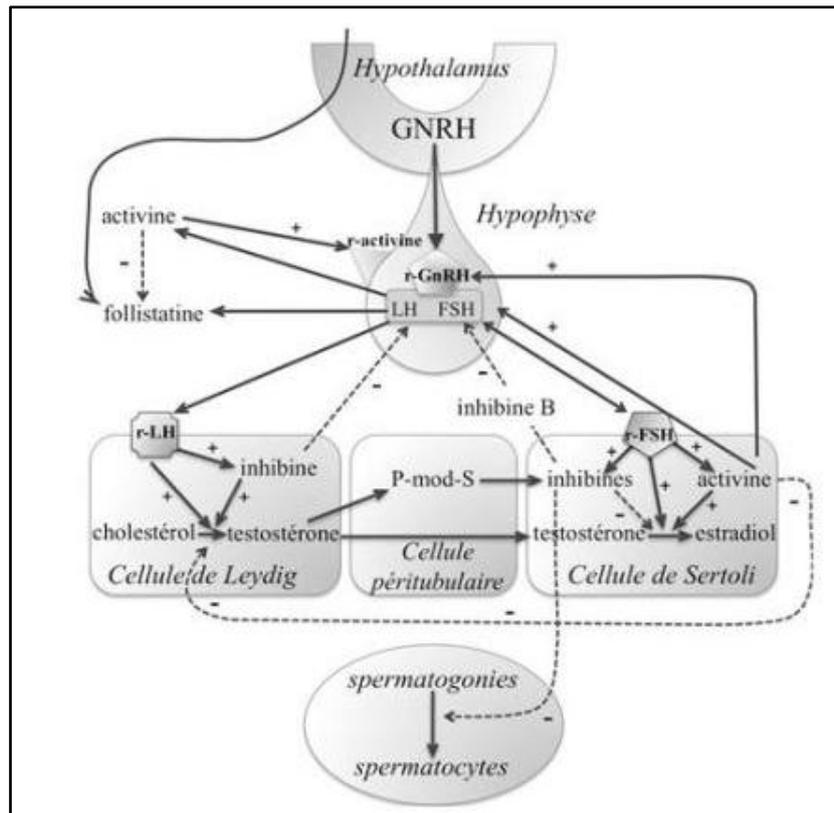
La première division méiotique survient après le stade diplotène, avec formation de spermatocytes de deuxième ordre (spermatocyte II). Ceux-ci subissent rapidement (en quelques heures) la deuxième division méiotique qui sépare les deux chromatides de chaque chromosome, aboutissant à des spermatides haploïdes (Figure 1)(PonceletetSifer, 2011).

### **1.2.3 La spermiogénèse**

Processus dans lequel une profonde restructuration morphologique et biochimique se produit avec notamment la compaction de la chromatine nucléaire, la réduction cytoplasmique et la formation de l'acrosome et du flagelle(Hess etde Franka, 2008).

## **1.3 Contrôle neuro-endocrinien de la fonction testiculaire**

La fonction testiculaire est régulée en grande partie par l'axe hypothalamo-hypophyso- testiculaire (Figure 5).



**Figure 5** : Schéma des différentes composantes de l'axe hypothalamo-hypophysotesticulaire (Poncelet et Sifer, 2011).

### 1.3.1 Les gonadotrophines

➤ **La Follicle Stimulating Hormone (FSH)** : elle est l'hormone hypophysaire qui a une action principale sur la spermatogénèse. Cependant, seule, n'est pas suffisante pour assurer une spermatogénèse normale. Un des nombreux effets de la FSH sur les cellules de Sertoli est d'entraîner la libération de lactate (substrat préféré au glucose par les spermatozoaires de 1<sup>er</sup> ordre) permettant de fournir l'énergie nécessaire aux cellules germinales en développement (Courchesne, 2009). Elle active également la protéine CREB (CRE-Binding Protein), qui initie à son tour la transcription de gènes essentiels à la différenciation des cellules germinales (Walker *et al*, 1998).

➤ **La Luteinizing Hormone (LH)** : agit aussi sur la spermatogénèse mais de façon indirecte. Son action principale se passe sur les cellules de Leydig qui produisent la testostérone. La FSH associée à la LH entraîne la production, par les cellules de Sertoli, d'une protéine de liaison appelée ABP (Androgen Binding Protein)

qui permet le transport de la testostérone depuis la partie basale vers les cellules germinales (HagenasetRitzén, 1975).

➤ **La testostérone** : les récepteurs aux androgènes (AR) sont présents dans les cellules de Leydig, les cellules péritubulaires et les cellules de Sertoli. Il est connu que la testostérone intervient dans le maintien de la spermatogenèse, cependant les mécanismes par lesquels elle agit ne sont pas encore définis. En effet, la réduction du taux de testostérone testiculaire après hypophysectomie, l'administration d'anti-androgènes ou la destruction des cellules de Leydig sont responsables du détachement des spermatides en développement de la cellule de Sertoli, et de l'arrêt de la spermatogenèse au cours du processus de la méiose ou de la spermiogénèse chez le rat (Walker, 2010).

➤ **La prolactine** : des taux élevés de PRL ont pour conséquence une infertilité chez l'homme (Krause, 1978 ; Micic *et al*, 1982). D'autre part, les cellules de Sertoli expriment les récepteurs à la PRL (Guillaumot et Benahmed, 1999), et la fixation de celle-ci stimule leur croissance, la sécrétion de lactate et la synthèse de nombreuses protéines nécessaires à la spermatogenèse (Scarabelli *et al*, 2003).

### **1.3.2 Contrôle de la sécrétion des gonadotrophines**

Ce contrôle résulte de mécanismes complexes encore mal élucidés.

➤ **La Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH)** d'origine hypothalamique assure le contrôle principal.

➤ **La testostérone** exerce également un rôle dans la boucle de rétrocontrôle en inhibant la sécrétion de LH et de GnRH par l'hypophyse et l'hypothalamus respectivement (Figure 3).

➤ **L'inhibine et l'activine** : des études sur les rongeurs ont établi que l'inhibine et l'activine modulent le nombre de spermatogonies et de cellules de Sertoli : les inhibines exercent un effet inhibiteur/répresseur alors que les activines présentent un effet stimulateur (De Kretser *et al*, 2004).

### **1.3.3 Autres hormones**

Les hormones thyroïdiennes, surrénaliennes (le cortisol abaisse le taux de testostérone plasmatique chez l'homme), pancréatiques (l'insuline stimule la

stéroïdogénèse) interviennent également dans la régulation des fonctions testiculaires (Poncelet et Sifer, 2011).

## **2. L'infertilité masculine**

L'infertilité est communément définie comme l'impossibilité pour un couple de concevoir une grossesse après douze mois de rapports sexuels réguliers et non protégés (Liu et Handelsman, 2003).

Les infertilités du couple, peuvent résulter de facteurs masculins et/ou féminins. Dans 35% des cas l'infertilité est due à des facteurs féminins, dans 30% des cas sont dues généralement à un facteur masculin seul, tandis que 20% des cas sont dus à des facteurs masculins et féminins. Quant au 15% des cas restant le problème d'infertilité reste inexpliqué.

L'infertilité masculine est multifactorielle et les étiologies peuvent être regroupées en causes génétiques et non génétiques. Cependant, dans environ 40% des cas, la cause de l'infertilité reste inconnue ou idiopathique (Agata, 2010).

L'infertilité masculine est diagnostiquée sur la base des paramètres spermatiques.

### **2.1 Paramètres spermatiques**

L'organisation mondiale de la santé (OMS, 1999) a établi des critères pour l'évaluation des paramètres du sperme des hommes infertiles basés sur la concentration du sperme, la mobilité et la morphologie (Tableau 1).

**Tableau 1** : Paramètres spermatiques normaux définis selon les critères de l'OMS.

Type d'infertilité	Paramètres spermatiques		
	Concentration (10 <sup>6</sup> /ml)	Mobilité (%)	Morphologie Normale (%)
Oligospermie	<20	Normal	Normal
- Modérée	≥ 5 mais < 20	Normal	Normal
- Sévère	<5 mais ≥ 1	Normal	Normal
- Très sévère	< 1	Normal	Normal
Asthénozoospermie	Normal	< 50	Normal
Térazozoospermie (OAT)	Normal	Normal	< 30
OligoAsthénoTerazoospermie	< 20	< 50	< 30
Azoospermie	Pas de spermatozoïdes dans l'éjaculat		
Aspermie	Pas d'éjaculat		
Leucospermie	Présence de polynucléaires dans le sperme		
Nécrozoospermie	Altération de la vitalité des spermatozoïdes		
Paramètres spermatiques normales	≥ 20	≥ 50	≥ 30

Un tableau avec les nouveaux paramètres spermatiques (2010) de l'OMS se situe dans l'annexe I.

### 2.2 Étiologie

L'infertilité masculine a été associée à des facteurs non génétiques et génétiques.

Les facteurs non génétiques de l'infertilité masculine peuvent inclure :

- des déséquilibres hormonaux,
- des problèmes de cryptorchidie,
- l'obstruction acquise,
- varicocèle,
- une maladie chronique,
- des facteurs immunologiques,
- l'impuissance,
- l'utilisation de drogues récréatives, la chimiothérapie et les radiations.
- Récemment, il a été rapporté que l'exposition à des facteurs environnementaux joue également un rôle important (Agata, 2010).

Pour les facteurs génétiques d'infertilité masculine, on cite les anomalies chromosomiques somatiques, les microdélétions du chromosome Y et des mutations géniques (Agata, 2010).

### **2.3 Exploration de l'infertilité masculine**

La recherche de causes génétiques d'une pathologie, part toujours du phénotype des patients atteints. Pour l'infertilité, la situation est plus difficile car de multiples causes génétiques peuvent correspondre à une anomalie phénotypique identique comme la diminution du nombre ou l'absence de spermatozoïdes chez l'homme.

Il existe trois types d'infertilité :

➤ **l'infertilité Coïtal** : la production de spermatozoïdes ainsi que les voies génitales sont normales, mais l'infertilité est secondaire à une dysfonction sexuelle (Abdel Raheem *et al*, 2012).

➤ **de nature obstructive** : encore appelées « infertilités excrétoires » représentant entre 30% et 40% des cas d'azoospermie, elles se définissent par un obstacle sur le tractus génital alors même que la production de gamètes est normale. Le bilan hormonal est normal (Ravel, 2007).

➤ **de nature non obstructive** : encore appelées « infertilités sécrétoires », elles se traduisent par des oligozoospermies plus ou moins sévères ou des azoospermies avec atteinte de la spermatogenèse. Le bilan hormonal est perturbé, en rapport avec un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyséogonadique avec, comme principal signe, une FSH augmentée et une inhibine B diminuée. La biochimie séminale est normale ou montre des marqueurs globalement diminués (Ravel, 2007). Les causes de cette infertilité peuvent être :

- **non idiopathiques** : le patient a eu une cryptorchidie ou une orchite, ou bien l'infertilité peut être expliquée par la prise médicamenteuse, la chimiothérapie, la radiothérapie. Ce qui a provoqué l'altération de la spermatogenèse voire même son arrêt. Ce sont donc des causes organiques.

- **idiopathiques** : lorsqu'aucune explication plausible de l'infertilité n'est donnée, des causes génétiques sont impliquées. Cependant, elles restent souvent non confirmées en raison du très grand nombre de gènes impliqués dans la spermatogenèse (Ravel, 2007). Trois arguments en faveur d'une origine génétique de l'infertilité doivent être cités :

- les réarrangements chromosomiques sont retrouvés avec une fréquence supérieure à la normale chez des hommes infertiles. Ces réarrangements pourraient

être responsables d'une anomalie mécanique de la méiose mais aussi de l'inactivation d'un gène crucial pour la spermatogenèse ;

- des cas familiaux de stérilité ont été décrits dans la littérature, avec plusieurs membres d'une fratrie atteints ou plusieurs individus infertiles de la même famille sur plusieurs générations (oncle-neveu par exemple). La présence de consanguinité chez les parents de certains patients stériles laisse à supposer une transmission récessive de gènes mutés impliqués dans la spermatogenèse ;

- les modèles animaux montrent que des mutations géniques spontanées ou induites sont responsables d'infertilité. On estime, sur la base de l'extrapolation à l'homme des données obtenues à partir de l'étude du génome de la drosophile ou de la souris, que les gènes impliqués dans le bon déroulement de la spermatogenèse sont plusieurs centaines, voire des milliers (Vialard *et al*, 2009).

### **2.4 Caryotype et infertilité masculine**

Les techniques de cytogénétique ont beaucoup évolué depuis la découverte du nombre exact de chromosomes chez l'homme en 1956. Le caryotype standard est utilisé depuis 1959 en cytogénétique classique. Il permet initialement une résolution de 10 à 15 Mb. À partir des années 1970, le marquage en bandes et le caryotype haute résolution ont permis d'améliorer la résolution et la sensibilité de l'analyse cytogénétique (Hugon-Rodin, 2010).

Classiquement, un marquage de l'euchromatine en bandes G (Giemsa) et en bandes R (Reverse) est réalisé.

- **Les bandes G** : sont obtenues par dénaturation enzymatique, avec la trypsine. Cette dernière digère les protéines et permet l'apparition après coloration au Giemsa d'une succession de bandes permettant de classer et d'analyser les chromosomes. Les bandes G correspondent aux bandes R négatives. Les bandes G marquent des régions d'ADN riches en liaison A-T et représentent des centres de condensation précoces pauvres en gènes actifs et en séquences Alu (Egea, 2010).

- **Les bandes R** : sont obtenues par dénaturation thermique des chromosomes. Elles marquent des régions d'ADN riches en liaison G-C correspondant à des régions riches en gènes actifs et en séquences Alu (Egea, 2010).

Il existe par ailleurs d'autres techniques de marquage complémentaires qui permettent d'analyser certaines régions particulières du génome :

➤ **les bandes C** : qui, par coloration au sulfate de Baryum, mettent en évidence l'hétérochromatine constitutive (1, 9, 16, Y). Elles correspondent à des régions non codantes du génome comme les régions centromériques (Arrighi et Hsu, 1971).

➤ **les bandes Q** : superposables aux bandes G, colorent intensément la partie distale, hétérochromatique, des bras longs de l'Y, certains centromères et certains bras courts des acrocentriques (Caspersson *et al*, 1970).

➤ **les NOR** qui, par dépôt de nitrate d'argent, mettent en évidence les organisateurs nucléolaires. Ces structures correspondent aux régions du génome contenant les gènes qui codent pour les ARN ribosomiaux (Bloom et Goodpasture, 1976).

La place des anomalies chromosomiques congénitales dans l'étiologie de l'infertilité masculine n'est pas négligeable.

Les anomalies chromosomiques associées à des troubles de la gamétogenèse, et plus particulièrement chez l'homme, peuvent être classées en deux grandes catégories :

- celles affectant le nombre des chromosomes (aneuploïdies) et
- celles touchant leur structure.

Ces deux types d'anomalies sont retrouvés dans 14% des azoospermies, avec des mutations touchant préférentiellement les gonosomes (chromosomes sexuels) et dans 5% des oligospermies on retrouve des anomalies touchant préférentiellement les autosomes (Vialard *et al*, 2009).

### **2.4.1 Le syndrome de Klinefelter et la mosaïque XXY**

Le syndrome de Klinefelter (SK) est l'aneuploïdie des gonosomes la plus fréquente chez les hommes, survenant chez environ 0,1 à 0,2% des nouveau-nés de sexe masculin. La prévalence de SK chez les hommes infertiles est très élevée, pouvant aller jusqu'à 5% en oligozoospermie sévère et 10% en azoospermie (Vialard *et al*, 2009). Le SK est une forme de défaillance testiculaire primaire avec hypotrophie testiculaire et une élévation du niveau des gonadotrophines plasmatiques, et il représente la forme la plus commune de l'hypogonadisme masculin.

L'infertilité pourrait être due à :

- une anomalie de la méiose, la formation du complexe synaptonémal de l'X et l'Y dans la vésicule sexuelle pourrait être perturbée par la présence d'un chromosome X surnuméraire (Solari, 1999) ;

- la surexpression de gènes sur l'X: sept gènes de spermatogenèse sont en effet portés par l'X : FTHL17 (Ferritin, heavy polypeptide-like 17), USP26 (UbiquitinSpecific Peptidase 26), TKTL1(TransKeTolase-Like 1),TAF7L(TAF7-like RNA polymerase II, TATA box bindingprotein (TBP)-associated factor), NFX2(Nuclear transcription Factor, X-boxbinding 2), TEX13A/B(TestisEXpressedgene 13), ainsi que le gène du récepteur aux androgènes (AR), le gène FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1)impliqué dans le syndrome de l'X fragile et le gène de l'hélicaseXH2(Vogt *et al*, 2008).

Néanmoins, il existe des cas de syndrome de Klinefelter en mosaïque, associant des cellules 47,XXY majoritaires à une faible proportion decellules 46,XY, où l'on retrouve des spermatozoïdes lors d'une biopsie testiculaire ou, beaucoup plus rarement, dans l'éjaculat.L'incidence de l'aneuploïdie des spermatozoïdes est augmentée dans le SK(Laron *et al*, 1982).

### **2.4.2 Le syndrome du mâle XYY**

Le caryotype 47,XYY est la deuxième aneuploïdie la plus fréquente des chromosomes sexuels. L'incidence est de 1pour 1000 de l'ensemble des naissances vivantes de sexe masculin (Torniero *et al*, 2011).

Les hommes porteurs sontphénotypiquement normaux, et ils sont généralementgrands (plus de 2mètres). L'origine de ce trouble est une non disjonction paternelle à la méiose II. L'analyse du sperme révèle généralement une oligozoospermie sévère ou une azoospermie.

Les hommes 47,XYY sont pour la plupartféconds. La perte pré-méiotique du chromosome Y surnuméraire permet la réalisation de la spermatogenèse et la production de spermatozoïdes normaux (Gabriel *et al*, 1996).

### **2.4.3 Mâle 46, XX**

L'anomalie chromosomique 46,XX est observée essentiellement chez les mâles azoospermiques, avec une fréquence de 0,9% (Mau-Holzmann, 2005). Le phénotype est semblable au syndrome de Klinefelter, mais avec une taille normaleet une intelligenceintacte. Le gène SRY est présent dans la plupart des cas (SRY+) ; dans ces cas les mâles sont toujours stériles, et l'azoospermie résulte de l'atrophie testiculaire. L'autre catégorie de mâle XX sont les mâles (SRY-), ce qui suppose une mutation dans

un gène autosomique ou lié à l'X impliqué dans la cascade du déterminisme sexuel qui devrait remplacer le gène SRY, permettant de déterminer des testicules en l'absence de SRY (Ferlin *et al*, 2006).

### **2.4.4 Anomalies de structure des chromosomes**

Parmi les anomalies de structure des chromosomes, les translocations robertsoniennes (fusions centriques) et réciproques peuvent être également responsables d'infertilité étant donné le caractère plutôt aléatoire des points de cassures chromosomiques rencontrés, il paraît peu vraisemblable que l'atteinte de la gamétogenèse soit due à la cassure d'un gène d'intérêt impliqué dans la formation des cellules germinales. Par contre, le risque de mal-ségrégation chromosomique dans les gamètes augmente la probabilité de voir naître un enfant porteur d'un syndrome malformatif avec retard mental mais également celui de fausses couches spontanées précoces, ce qui peut aboutir à un certain degré d'hypofertilité pour les couples concernés.

#### ➤ **Translocations robertsoniennes**

Les translocations robertsoniennes sont les anomalies chromosomiques structurales les plus fréquentes chez l'homme. Elles se produisent lorsque deux chromosomes acrocentriques (13,14, 15, 21, 22) fusionnent. Le résultat est la formation d'un seul chromosome anormal, généralement dicentrique. Les translocations sont des remaniements équilibrés à 45 chromosomes. L'incidence est d'environ 1 nouveau-né sur 1000 (Therman, 1993). Ce type d'anomalie peut survenir de novo dans environ 50% des cas ou être transmis par la mère ou le père. Les porteurs de la translocation robertsonienne ont généralement un phénotype normal. Dans les populations d'hommes infertiles 0,8% étaient porteurs d'une translocation robertsonienne, c'est jusqu'à neuf fois plus élevée que dans la population générale (Ferlin *et al*, 2006).

#### ➤ **Translocations réciproques**

Les translocations réciproques sont trouvées avec une fréquence de 0,9 sur 1000 nouveau-nés (Therman, 1993). Une translocation consiste en un échange réciproque de fragments entre deux chromosomes. En général, il n'y a aucune altération phénotypique apparente du porteur. Pour les couples qui ont subi des avortements

répétés, l'incidence des translocations chromosomiques est plus élevée que l'incidence actuelle en série des nouveau-nés (De Braekeleer, 1991).

### ➤ **Anomalies de structure du chromosome Y**

Malgré sa petite taille, des anomalies de structure ont pu être observées au caryotype et leur relation avec le phénotype d'infertilité a permis d'assigner à certaines régions du chromosome Y un rôle majeur dans la spermatogenèse.

#### - **Translocations impliquant le chromosome Y**

Le chromosome Y peut être impliqué dans des translocations avec le chromosome X, un autosome (à l'exception des chromosomes 11 et 20), ou un autre chromosome Y surnuméraire. Les translocations (X ; Y) entraînent des phénotypes très variables selon les gènes délétés, allant du phénotype masculin, au phénotype féminin, en passant par différents stades d'ambiguïtés sexuelles et/ou d'anomalies phénotypiques associées (petite taille, infertilité, dysmorphisme, retard mental, anomalies de la face, ...).

La fréquence des translocations (Y ; autosomes) est estimée à 1/2000 dans la population générale (Faure, 2007).

#### - **Isochromosomes Y**

L'isochromosome Y (iY) est constitué de deux bras identiques, soit longs, soit courts. Il survient lorsque le chromosome normal ne se divise pas longitudinalement mais transversalement.

Les phénotypes rapportés dans la littérature pour l'isochromosome du bras court, i(Yp) vont de l'ambiguïté sexuelle avec des stigmates de syndrome de Turner, à un phénotype masculin. À l'inverse, pour l'isochromosome du bras long, i(Yq) et du fait de l'absence du gène SRY, les phénotypes sont féminins, avec des gonades réduites à de fines bandelettes fibreuses avec impubérisme.

Le chromosome Y isodicentrique étant instable, il est souvent retrouvé en association avec une lignée cellulaire 45,X (Faure, 2007).

#### - **Chromosomes Y en anneau**

Les chromosomes en anneaux sont des chromosomes refermés sur eux-mêmes par leurs bras courts et longs après une cassure chromosomique dont la localisation déterminera la perte de fragments distaux p et q plus ou moins importants.

La taille de ces derniers et la nature des gènes qu'ils contiennent conditionneront ensuite le phénotype. En général, ce dernier est masculin car le gène SRY est souvent

conservé. Parfois, le phénotype est féminin, soit parce que le gène SRY est perdu lors de la formation de l'anneau, soit plutôt parce qu'il existe une lignée cellulaire 45,X importante. Les mosaïques 45,X/46,X r(Y) sont en effet extrêmement fréquentes en raison de la grande instabilité mitotique de ces anneaux (Ravel et Siffroi, 2009).

### - Les polymorphismes du chromosome Y

#### ➤ Longueur de l'hétérochromatine

La partie hétérochromatique en Yq12 du chromosome Y humain présente des tailles différentes selon les individus, sans entraîner d'anomalies phénotypiques.

#### ➤ Satellites du chromosome Y

La présence de satellites aux extrémités du bras long du chromosome Y (Yqs) est considérée comme une variation normale sans incidence phénotypique.

#### ➤ Inversions du chromosome Y

Les inversions du chromosome Y sont le plus souvent considérées comme des variants sans conséquence phénotypique.

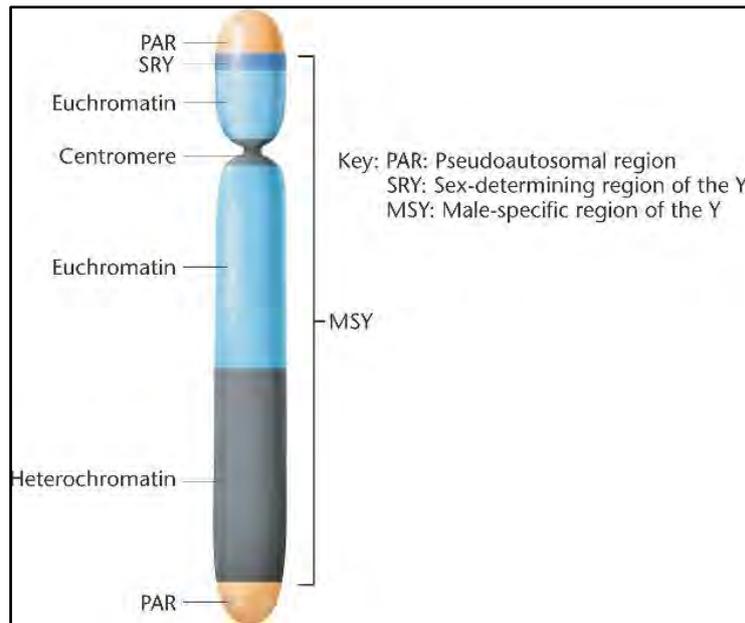
Les inversions péricentriques du chromosome Y (inv(Y)(p11q11)) sont le plus souvent héritées. On estime qu'elles sont présentes à l'état de variant normal dans 0,06% des cas. Elles entraînent une infertilité masculine lorsque qu'elles sont associées à une délétion. Les inversions paracentriques du bras long du chromosome Y, quant à elles, n'ont été décrites que très rarement dans la littérature (Faure, 2007).

## **2.5 Chromosome Y et infertilité masculine**

### **2.5.1 Structure du chromosome Y**

Le chromosome Y est l'un des plus petits chromosomes du génome humain, avec une taille totale d'environ 60 Mb. Environ 24 Mb se rapportent à la région euchromatique et environ 30 Mb se rapportent à la région hétérochromatique (le reste correspond à la région pseudo-autosomale PAR), combinées, les deux régions sont appelées NRY (Non-Recombining region of Y chromosome) actuellement rebaptisées MSY (Male Specific Region) (Figure 6), qui représentent environ 95% du chromosome Y (Butler, 2003).

Le chromosome Y suit un héritage purement paternel et est hérité complètement de père en fils à travers les générations ancestrales (Butler, 2003). Il peut être subdivisé en trois régions :



**Figure 6 :** Schéma de la structure globale du chromosome Y montrant les deux régions PAR encadrant la partie MSY (Ravel et Siffroi, 2009)

➤ **régions Pseudoautosomale (PARs)**

Les régions pseudoautosomales (PARs) sont les extrémités télomériques situées à la partie distale du bras court (Yp), dénommée PAR1, et est d'environ 2,5 Mb en longueur et à la partie distale du bras long (Yq), dénommée PAR2, qui est inférieure à 1Mb en longueur. Les deux régions contiennent des gènes homologues qui se recombinent avec les gènes homologues du chromosome X au cours de la méiose masculine (Butler, 2003).

➤ **région hétérochromatique**

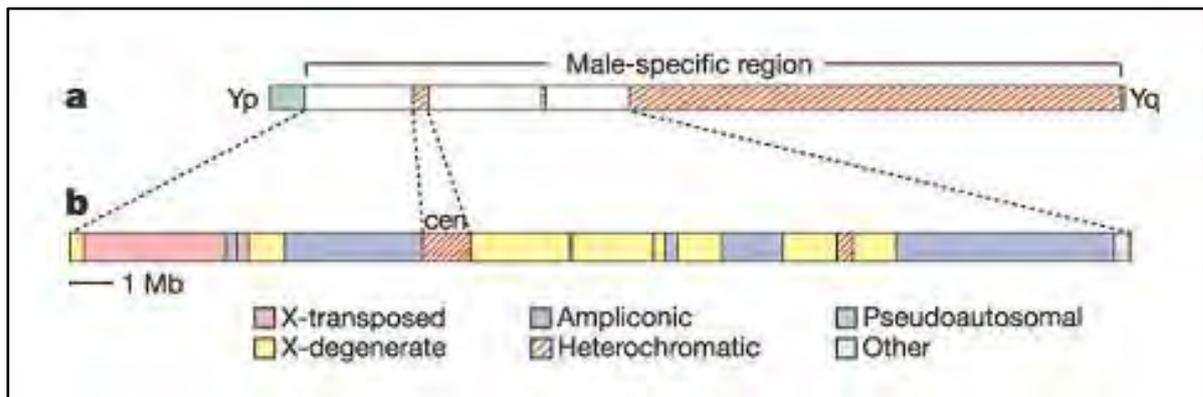
La région hétérochromatique est située sur la partie distale du bras long (Yq) du chromosome Y (Skaletsky *et al*, 2003) et comprend deux grandes séquences hautement répétées DYZ1 et DYZ2 et des séquences répétées alphas qui sont regroupées en tandem près du centromère et qui incluent le SINE (Short Interspersed Nuclear Element) majeur Alu, et diverses familles de séquences satellites (Gusmao *et al*, 1999).

➤ **région spécifiquement mâle (MSY) ou région non recombinante (NRY)**

La région spécifiquement mâle, située entre les régions PAR, représente la partie de l'Y qui normalement ne recombine jamais avec le chromosome X. Elle montre, dans la partie distale du bras long, une zone d'hétérochromatine non

fonctionnelle. La partie fonctionnelle ou euchromatique de MSY s'étend à la fois sur le bras court et la partie proximale du bras long, ce qui représente un peu moins de 1% du génome humain.

Le séquençage du chromosome Y a permis de préciser la structure moléculaire de cette région MSY et trois types de séquences particulières ont pu être individualisés (Figure 7).



**Figure 7** : Répartition des trois classes de séquence de l'euchromatine du chromosome Y (Charmot-Bensimon, 2006)

- Il existe tout d'abord une région dénommée « **X transposée** » de 3,4 Mb qui présente 99% d'identité avec la région Xq21.2 du bras long du chromosome X qui aurait été transposée sur le bras court de l'Y il y a relativement peu de temps (3 à 4 millions d'années). Cette région est pauvre en gènes mais riche en séquences répétées, comme les séquences LINE1 (Long Interspersed Nuclear Elements 1), qui représentent 60 % de l'ensemble (Ravel et Siffroi, 2009).

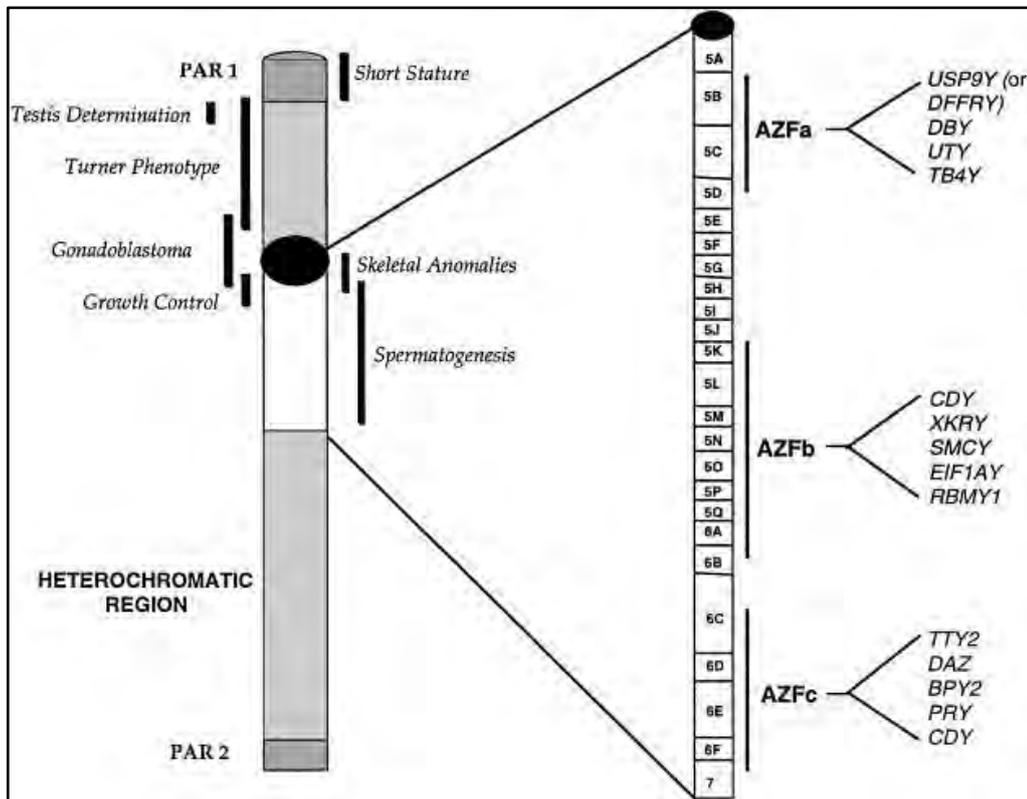
- Le deuxième type de séquences retrouvées dans le chromosome Y porte le nom de séquences « **X-dégénérées** », présentes à la fois sur le bras court et le bras long, et qui s'étendent sur 8,5 Mb. Ces séquences sont le témoin de l'origine commune des deux gonosomes que l'évolution a fait progressivement diverger. Elles renferment de nombreux pseudo-gènes et 16 gènes qui sont effectivement transcrits en protéines ou famille de protéines à expression plutôt ubiquitaire (Ravel et Siffroi, 2009).

- Enfin, le dernier type de séquences caractéristiques est de type amplicon et constitue près d'un tiers de la région MSY euchromatique. Elles se situent à la fois sur le bras court et long du chromosome et, sur le bras long, elles sont organisées en

palindromes (Figure 7). Dans ces amplicons se trouvent la plupart des gènes portés par l'Y et plus particulièrement ceux impliqués dans la spermatogenèse sous forme d'une soixantaine de gènes répartis en neuf familles différentes et à expression exclusivement ou majoritairement testiculaire. Au total, le chromosome Y humain contient 78 gènes codant pour 27 protéines ou familles de protéines dont 11 à expression testiculaire forte (Ravel et Siffroi, 2009).

### 2.5.2 Gènes du chromosome Y

Un certain nombre de gènes sur le chromosome Y ont été rapportés (HsChrY.shtml <http://www.ncbi.nlm.gov/genomeguide/>) (Figure 8).



**Figure 8 :** Représentation schématique des gènes et des régions AZF (AZoospermia Factor) du chromosome Y humain (AZFa, AZFbetAZFc). (Quintana-Murci, 2001)

#### ➤ Gène SRY

Le gène Sexe Determining Region of Y chromosome (SRY), aussi appelée TDF (Testis Determining Factor) est le plus important en raison de son implication dans le déterminisme du sexe masculin (Goodfellow et Lovell-Badge, 1993). Ce gène est

situé sur le bras court du chromosome Y en position Yp11.31 et code pour un facteur de transcription de 204 acides aminés à partir d'une seule ORF (Open Reading Frame) de 669 paires de bases (Behlke *et al*, 1993). Le SRY est un membre de protéines de liaison à l'ADN HMG (High Mobility Group) avec le domaine hautement conservée "HMG-box". Des mutations dans ce gène donnent lieu à des femmes XY avec dysgénésie gonadique et la translocation d'une partie de l'Y contenant ce gène sur le chromosome X conduit à un phénotype masculin avec une constitution chromosomique XX.

### ➤ **Les gènes domestiques**

Présents en copie unique sur le chromosome Y et exprimés dans de nombreux tissus. Ils possèdent des homologues sur le chromosome X, échappant à l'inactivation et codant pour des isoformes similaires, mais non identiques, aux produits des gènes correspondants sur le chromosome Y. Parmi eux, on peut citer Ubiquitin-Specific Protease 9 Y chromosome (USP9Y) (anciennement appelé Drosophila Fat-Facets Related Y) (DFFRY), Dead-box protein 3 Y chromosomal (DDX3Y) (anciennement appelé Dead Box Y (DBY), Ubiquitous Tetratricopeptide repeat motif Y (UTY), Selected Mouse Complementary DNA on the Y (SMCY) et eukaryotic translation-Initiation Factor 1A Y isoform (eIF1AY) (Faure, 2007) (Figure 8).

### ➤ **Les gènes exprimés spécifiquement au niveau testiculaire**

Présents en copies multiples le long du chromosome Y. Ils codent pour des protéines avec des fonctions spécialisées. Plus d'une dizaine de familles de gènes a été identifiée. C'est le cas par exemple de la famille RBM (RNA Binding Motif), DAZ (Deleted in AZoospermia), PRY (PTP-BL (Protein tyrosine phosphatase BAS like) Related Y), XKRY (XK related Y), BPY2 (Basic Protein on Y chromosome 2) et CDY (Chromo Domain Y) (Faure, 2007) (Figure 8).

Une liste des gènes du chromosome Y est présentée dans l'annexe.

### **2.5.3 Les microdélétions du chromosome Y**

Dès 1976, Tiepolo et Zuffardi, en décrivant de grandes délétions Yq terminales chez six patients azoospermiques, ont émis les premiers l'hypothèse de la présence d'un facteur de contrôle de la spermatogenèse dans la partie euchromatique proximale du bras long de l'Y (Yq11), facteur qui prendra ensuite l'appellation générique d'AZF. L'existence d'un tel facteur a ensuite été vérifiée par de très nombreuses observations cytogénétiques (Ravel et Siffroi, 2009).

Il existe trois régions sur le bras long du chromosome Y appelées :AZFa, AZFb et AZFc, dont les pertes sont associées soit à l'absence de spermatozoïdes soit à la diminution du nombre de spermatozoïdes. Les hommes porteurs de ces microdélétions sont en bonne santé apparente. Néanmoins, aucune étude de survie à long terme de ces patients n'a encore été publiée. Chacune de ces microdélétions est le résultat de la recombinaison entre blocs de séquences répétées flanquants les intervalles délétés.

#### ➤ **Les différents types de délétions de la région MSY**

##### **- Les délétions AZFa**

Les délétions AZFa sont la conséquence de recombinaison entre séquences homologues de nature rétrovirale (HERV15). Elles ne représentent que 5% des délétions AZF mais entraînent les atteintes les plus graves de la spermatogenèse puisqu'elles sont classiquement associées à une absence de cellules germinales et à un tableau de syndrome SertoliCellOnly (SCO). Curieusement, cette sévérité du phénotype testiculaire n'est pas corrélée au nombre de gènes perdus puisque seulement deux gènes s'expriment dans cette région, USP9Y et DDX3Y (Ravel *et al*, 2007).

##### **- Les délétions AZFb**

Les délétions complètes d'AZFb emportent 6,23 Mb et sont la conséquence de recombinaisons entre séquences palindromiques. Elles s'étendent sur 1,5 Mb de la région proximale d'AZFc (McElreavey *et al*, 2008). Représentant environ 15% des microdélétions de l'Y, elles s'accompagnent classiquement d'une azoospermie par blocage des cellules en méiose.

Une dizaine de gènes exprimés dans le testicule sont situés dans la région de délétion AZFb mais le mode d'expression dans l'organisme, ubiquitaire ou testicule-spécifique n'est pas clairement définie. Une délétion AZFb proximale limitée au gène HSFY a

été décrite chez un homme azoospermique. En fait, la famille de gènes qui a été la plus étudiée est celle des gènes RBMY qui comprend entre 20 et 50 membres répartis à la fois sur le bras court et le bras long du chromosome, sous la forme de gènes et de pseudo-gènes. L'étude de l'expression de ces gènes a permis, d'une part, de révéler le rôle fondamental joué par les exemplaires situés dans la région AZFb et, d'autre part, de montrer qu'en l'absence de protéine RBMY la spermatogenèse des patients ne va pas au-delà de la méiose (Ravel *et al*, 2007).

- **Les délétions AZFb+AZFc** sont également la conséquence de recombinaison entre séquences palindromiques, couvrent 7,66 Mb et n'emportent pas la région distale d'AZFc.

- **Les délétions AZFc**

Les délétions de la région AZFc sont les plus fréquentes (80% des microdélétions) et touchent un homme sur 4000. Ces hommes présentent une azoospermie ou une oligozoospermie sévère ( $<1 \times 10^6/ml$ ). Ces microdélétions, dénommées b2/b4 (Kuroda-Kawaguchi *et al*, 2001) sont la conséquence de recombinaisons entre deux éléments répétés de 229kb dans une région chromosomique presque entièrement composée de longues séquences répétées, directes ou inversées dénommées amplicons. C'est dans cette région AZFc que sont localisés plusieurs gènes candidats de la fertilité humaine dont trois copies du gène BPY2, deux copies de CDY1a et CDY1b ainsi que quatre copies du gène DAZ. Chacun de ces trois gènes pourrait contribuer conjointement au phénotype d'infertilité ou bien encore être un gène majeur d'infertilité (McElreavey *et al*, 2008).

Les différents types de microdélétions dans la région AZF sont résumés dans la figure 8.

### **2.6 Mutations géniques et infertilité masculine**

Plusieurs centaines de gènes sont nécessaires pour un développement sexuel normal, pour la détermination testiculaire, la descente des testicules, et de la spermatogenèse.

### **2.6.1 Mutations du gène CFTR**

Le gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) se trouve dans la région q31.2 sur le bras long du chromosome 7 humain. Environ 80% des mutations observées chez les patients atteints de fibrose kystique (CF) résultent de la délétion de trois paires de bases causant la perte de l'acide aminé phénylalanine situé à la position 508 dans la protéine (F508). Plus que 900 mutations ont été décrites (Ferlin *et al*, 2006). L'infertilité causée par une azoospermie obstructive a été signalée dans plus de 95% des hommes atteints de mucoviscidose. Par ailleurs, il est admis que 60 à 70% des patients avec absence congénitale bilatérale des canaux déférents (ABCD) présentent des mutations dans le gène CFTR, sans autres symptômes cliniques de la mucoviscidose. La spermatogenèse chez ces patients est normale, et l'aneuploïdie n'est pas augmentée dans le sperme des patients touchés (Ferlin *et al*, 2006).

### **2.6.2 Mutations du gène du récepteur aux androgènes**

Les androgènes et le récepteur fonctionnel aux androgènes (AR) sont essentiels pour le développement et la maintenance du phénotype masculin et de la spermatogenèse. L'AR est codé par un gène situé sur le chromosome X en Xq11-q12 et s'étend sur environ 90 kb et comporte 8 exons. Plus de 600 mutations ponctuelles ont été décrites sur ce récepteur entraînant le plus souvent un syndrome d'insensibilité aux androgènes et sont responsables d'environ la moitié des cas de pseudohermaphrodisme masculin (Ravel, 2007).

### **2.6.3 Mutations des gènes INSL3-RXFP2**

Insulin-Like Factor 3 (INSL3), également connu sous le nom de Relaxine-Like Factor (RLF) est un membre de la famille des relaxine-like hormones produites par les cellules de Leydig. Ce gène comprend deux exons, avec un intron interrompant le domaine C-peptide de codage, il est localisé sur le chromosome 19. Les recherches menées sur INSL3 chez l'homme ont augmenté ces dernières années.

Le rôle de ce gène dans la cryptorchidie humaine a été suggéré depuis la découverte de plusieurs mutations dans INSL3 et RXFP2 (Relaxin/insulin-like Family Peptide receptor 2) conduisant à une substitution d'acide aminé. Une revue de la littérature a

trouvé une prévalence de mutations de 4 à 5% chez les hommes atteints de cryptorchidie ou ex-cryptorchidie. Certaines de ces mutations représentent des polymorphismes communs trouvés avec une fréquence similaire à la fois chez les patients et les contrôles, tandis que sept d'entre eux ont été détectés exclusivement chez les hommes ayant des antécédents de cryptorchidie (P49S, R73X, P93L, R102C, R102H, N110K dans INSL3 et T222P dans RXFP2). Toutes ces mutations étaient hétérozygotes, et les patients avec deux allèles mutants ou hétérozygotes composites pour des mutations dans INSL3 et RXFP2 n'ont jamais été retrouvés (Ferlin *et al*, 2006).

### **2.6.4 Mutations du gène AURKC et macrozoospermie**

Le gène AURKC (Aurora Kinase C) situé en 19q13.43, comporte 7 exons, code pour un membre de la sous-famille Auroradessérine/thréoninekinases, il est fortement exprimé au niveau des testicules (El Inati *et al*, 2012). La protéine codée forme des complexes avec Aurora-B et avec les protéines centromériques internes et peut jouer un rôle dans l'organisation des microtubules lors de la mitose. Des mutations de type délétion avec décalage de cadre de lecture (c.114delC) dans ce gène ont été rapportées en association avec une morphologie anormale de spermatozoïdes (macrozoospermie) (Dieterich *et al*, 2009).

La mutation homozygote a été identifiée chez 10 hommes infertiles souffrant de macrozoospermie et originaires de nord-africain et fournit un support solide de son effet causatif avec ce type d'anomalie spermatique (Dieterich *et al*, 2007).

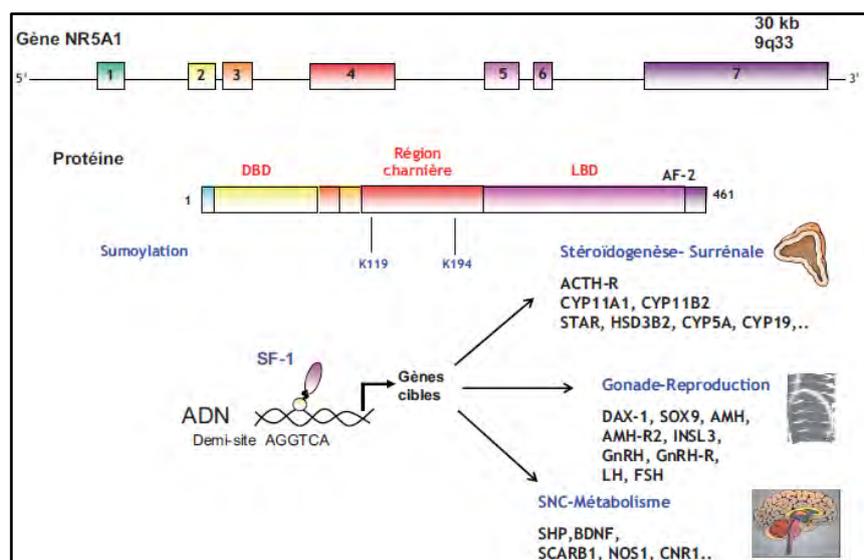
Cette découverte a été renforcée par la suite par d'autres études qui ont montré que 100% (66 individus) des hommes infertiles avec macrozoospermie et originaire du Maghreb (Maroc) sont porteurs de la mutation sur les deux allèles. De plus, la majorité d'entre eux étaient homozygotes c.114delC (Dieterich *et al*, 2007 ; 2009 ; Kerch *et al*, 2011). Aucun homozygote n'a été trouvé dans le groupe témoin de plusieurs hommes fertiles (Dieterich *et al* ; 2007, El Kerch *et al*, 2011). L'analyse généalogique de deux familles a révélé que tous les mâles homozygotes étaient stériles alors que les femmes et les hommes hétérozygotes étaient fertiles (Dieterich *et al*, 2007, 2009). Cela indique un modèle d'héritage récessif pour la transmission de mutation AURKC avec le phénotype d'infertilité réservée aux hommes.

**2.6.5 Mutations du gène NR5A1 (SF1)**

Le gène NR5A1 (Sous-famille des récepteurs nucléaires 5, group A, membre 1) précédemment connu sous le nom de SF-1 (Steroidogenic Factor 1), découvert en 1992 par Keith Parker, est un régulateur clé de la transcription de gènes impliqués dans l'axe hypothalamo-hypophysaire-stéroïdogénique. Son expression apparaît précocement au cours de la vie fœtale dans les tissus stéroïdogènes surrénalien et gonadique, mais aussi dans l'hypothalamus (Ferraz de Souza *et al*, 2011).

NR5A1 a été initialement identifié dans la glande surrénale de bœuf sous le terme d'Ad4BP (Adrenal 4-Binding Protein). Ce gène est localisé chez l'homme sur le chromosome 9 en position 9q33 et comporte 7 exons qui s'étendent sur environ 30 kb (Figure 9), ce qui en fait un gène relativement facile à analyser. Le premier exon est non codant. Les 6 exons suivants codent pour les différents domaines fonctionnels classiques des récepteurs nucléaires. NR5A1 est une protéine de 461 acides aminés (Martinerie *et al*, 2009).

La protéine NR5A1 est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, la plus grande famille de facteurs de transcription chez les eucaryotes. Elle comporte 3 domaines fonctionnels (Figure 9) : DBD ; domaine de liaison à l'ADN, la région charnière et le LBD ou domaine de liaison au ligand, incluant le domaine d'activation fonctionnelle AF2 facilitant le recrutement des coactivateurs transcriptionnels. NR5A1 se lie sur le promoteur de gènes cibles sous forme monomérique à un demi-site ERE (Estrogen Response Element) classique (Martinerie *et al*, 2009).



**Figure 9 :** Structure du gène et de la protéine NR5A1 (Martinerie *et al*, 2009).

Les mutations NR5A1 chez l'homme ont d'abord été identifiées chez des patients avec dysgénésie gonadique (GD) 46, XY, avec une insuffisance surrénale (Achermann *et al*, 1999 ; 2002). Toutefois, ces derniers temps, les mutations NR5A1 sont plus généralement associées à une gamme de troubles du développement sexuel (DSD), tels que la dysgénésie gonadique partielle ou complète (Allali *et al*, 2011), l'hypospadias (Kohler *et al*, 2009) et l'anorchie bilatérale avec micropénis (Philibert *et al*, 2007). En outre, des mutations dans NR5A1 ont également été démontrées d'être associées à une insuffisance ovarienne chez les femmes 46, XX présentant une aménorrhée primaire ou une insuffisance ovarienne prématurée (Lourenco *et al*, 2009). Récemment, des mutations faux-sens altérant l'activité transcriptionnelle ont été signalées chez des hommes atteints d'insuffisance spermatique sévère (Bashamboo *et al*, 2010). Considérant tous les phénotypes décrits, plus de 30 mutations du NR5A1 ont été décrites (Annexe III).

### **2.7 Polymorphisme génétique et infertilité masculine**

Un gène est qualifié de polymorphe lorsque plusieurs allèles sont présents chez au moins 1% des individus. Un polymorphisme génétique se définit par la coexistence de plusieurs allèles (variation au niveau de la séquence nucléotidique) pour un gène donné dans une population. Ces variations peuvent concerner un seul nucléotide (SNP), intra génique ou non, ou une très large zone d'un chromosome incluant plusieurs gènes. Les SNPs sont très fréquents puisqu'il en existe plusieurs millions dans le génome humain. La modification d'une paire de base apparaît environ toutes les 800 paires de bases. Cette propriété confère aux SNPs un rôle de marqueurs du génome et d'outils en cytogénétique moléculaire.

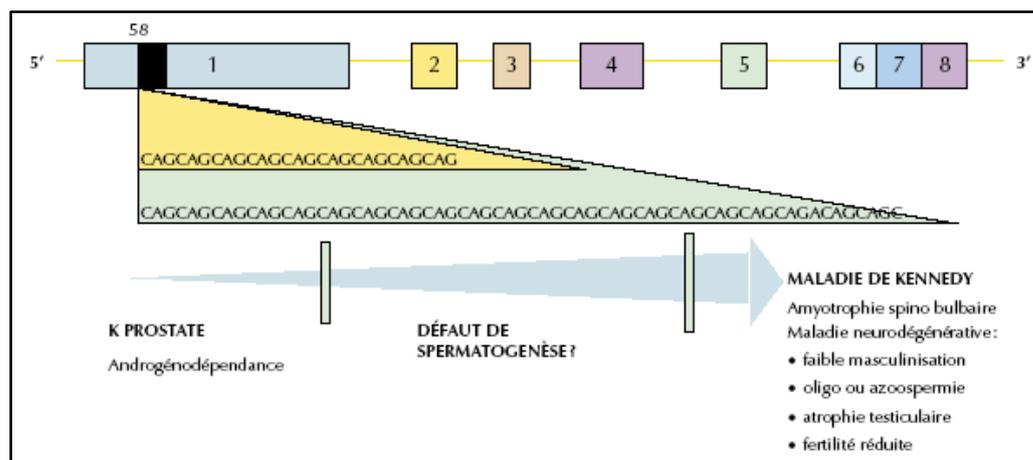
L'analyse des polymorphismes des gènes impliqués dans la spermatogenèse représente l'un des domaines les plus dynamiques de la recherche en génétique de l'infertilité masculine. Les polymorphismes ou variantes génétiques dans ces gènes sont considérés comme des facteurs de risque potentiels qui peuvent contribuer à la sévérité de l'insuffisance spermatique. Plusieurs variantes polymorphes ont été décrites en association avec l'infertilité masculine. Toutefois, ces études d'association n'apportent pas souvent un résultat unique.

Les effets phénotypiques du polymorphisme génétique sont modulés par d'autres facteurs génétiques ou des facteurs génétiques et environnementaux, fournissant un exemple important de l'interaction gène-environnement dans le développement du phénotype et peuvent par conséquent conduire à une insuffisance ou un dysfonctionnement testiculaire spermatogénique (Hugon-Rodin, 2010).

### 2.7.1 Polymorphisme de l'exon 1 du gène du récepteur aux androgènes

L'AR présente deux sites polymorphes dans l'exon 1, caractérisé par des nombres différents de répétitions CAG et GGC. Le nombre de répétitions CAG et GGC sont comprises entre 10 à 35 et de 4 à 24, respectivement, chez l'homme normal (Ferlin *et al*, 2006).

Une expansion de plus de 40 répétitions entraîne la maladie de Kennedy (pathologie récessive liée à l'X caractérisée par une atrophie musculaire spinobulbaire). Cette dernière, liée à la neurodégénérescence des motoneurones, associe une faiblesse musculaire proximale qui apparaît progressivement chez l'homme entre 30 et 40 ans, une oligo ou azoospermie, un défaut de masculinisation, une atrophie testiculaire et une fertilité réduite. D'autres maladies sont dues à une expansion de triplets différents des CAG comme par exemple le syndrome de l'X fragile (CCG), l'ataxie de Friedreich (GAA) ou encore la dystrophie myotonique de Steinert (CTG). La caractéristique commune de toutes ces maladies est la présence d'expansions de triplets et l'instabilité de ces séquences (Figure 10) (Ravel *et al*, 2007).



**Figure 10 :** Polymorphisme CAG du premier exon du gène du récepteur aux androgènes (Ravel *et al*, 2007)

### **2.7.2 DAZL**

DAZL est un homologue autosomique du gène lié à Y DAZ, et il est exprimé dans les cellules germinales où il code pour une protéine RNA binding. Aucune mutation dans le gène DAZL n'a été signalée jusqu'à présent, à l'exception de deux simples polymorphismes nucléotidiques (SNP) dans l'exon2 (A260G) et 3 (A386G) (Hsu *et al*, 2010).

### **2.7.3 POLG « ADN polymérase »**

Elle est responsable de la réplication et la réparation du génome mitochondrial. L'ADN polymérase  $\gamma$  humaine est constituée d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité accessoire. Des mutations dans le gène de la sous-unité catalytique (POLG) ont été démontrées comme étant une cause fréquente de maladies mitochondriales. Le gène POLG humain contient une unité de 10 répétitions de trinuécléotides CAG codant pour un tronçon de poly-glutamine à proximité de la N-terminale de la protéine mature. Les premières études ont suggéré que l'altération de la répétition CAG pourrait être associée à la perte de la qualité du sperme et de contribuer de 5 à 10% des cas d'infertilité masculine dans la population européenne. Cependant, des études plus récentes d'Italie et de la France ont indiqué que des altérations dans la répétition du trinuécléotide CAG de POLG ont été trouvées avec la même fréquence chez les hommes normaux et infertiles. Par conséquent, il n'est pas encore précisé si le polymorphisme des répétitions trinuécléotidiques de POLG peut contribuer à l'infertilité masculine ou à une spermatogenèse défectueuse (Ferlin *et al*, 2006).

### **2.7.4 FSHR**

L'interaction entre la FSH et son récepteur (FSHR) est essentielle pour l'ovogenèse et la spermatogenèse normale. Récemment, des polymorphismes de type SNP ont été attribués au gène FSHR. Ceux-ci donnent lieu à des haplotypes FSHR différents qui modifient l'action de la FSH. Dans l'exon10 du gène de l'FSHR deux SNP sont trouvés et correspondent aux positions 307 et 680 d'acides aminés de la protéine mature.

Une étude récente (Ahda *et al*, 2005) a rapporté une fréquence allélique différente chez une population d'hommes avec azoospermie par rapport aux hommes normozoospermiques. Il est donc possible que les haplotypes FSHR pourrait représenter l'un des polymorphismes génétiques qui, seuls ou en combinaison,

peuvent influencer la spermatogenèse. L'importance de cette association doit maintenant être vérifiée par des études complémentaires dans d'autres populations, peut-être d'origine ethnique différente (Ferlin *et al*, 2006).

### **2.7.5 Récepteur d'Estrogen (ER) $\alpha$**

La réponse physiologique aux œstrogènes est médiée par au moins deux isoformes fonctionnels de récepteur aux œstrogènes (ER), codées par deux gènes différents. Le dépistage génétique du locus du gène ER a révélé l'existence de plusieurs sites polymorphes (Ferlin *et al*, 2006). Les plus largement étudiés sont les RFLPP *vuII* et *XbaI* dans l'intron 1.

Des études récentes ont suggéré une association entre les polymorphismes *Era* et l'infertilité masculine, bien que de données définitives ne peuvent pas être extrapolées (Ferlin *et al*, 2006).

### **2.7.6 MTHFR**

L'enzyme 5-10 méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) est une enzyme clé dans le métabolisme des folates (Annexe IV). L'activité normale de cette enzyme permet de maintenir le pool de folates et de méthionine circulants et de prévenir une éventuelle augmentation de la concentration en homocystéine. MTHFR joue également un rôle dans les processus de méthylation de l'ADN, de protéines, de neurotransmetteurs et de phospholipides. La méthylation de l'ADN joue un rôle primordial dans la régulation de l'expression des gènes et le maintien de la stabilité génomique. La MTHFR est également impliquée dans la production de désoxythymidine monophosphate (dTMP) via la synthèse de purines et la thymidilate synthase. MTHFR est donc un élément essentiel à la provision de nucléotides nécessaires à la synthèse d'ADN et sa réparation (Annexe IV) (Zhou-Cun *et al*, 2007). La voie enzymatique des folates est ainsi impliquée dans la stabilité de l'ADN et toute altération sur cette voie peut induire des cassures simple ou double brin dans l'ADN et/ou modifier le taux d'expression de certains gènes voire induire des anomalies de la ségrégation chromosomique. Par ce biais, les folates jouent un rôle essentiel dans les régulations épigénétiques de l'expression des gènes. Un déficit en folates, par carence d'apport ou en rapport avec des polymorphismes nucléotidiques se traduit par une

hypo méthylation de l'ADN et d'autres molécules, ainsi que par une accumulation d'homocystéine.

Le gène MTHFR a été localisé sur le chromosome 1, en 1p36.3. Il comprend 11 exons et s'étend sur une longueur de 2.2 Kb (Goyette *et al*, 1998). Une mutation ponctuelle dans sa région codante, entraînant la substitution d'une cytosine par une thymidine au niveau de la 677e paire de base dans le quatrième exon (C677T), aboutit à la substitution d'une alanine par une valine dans la séquence protéique. Cette mutation entraîne une diminution de l'activité enzymatique de 30 % chez les hétérozygotes (CT) et de 80% chez les homozygotes (TT) (Ravel *et al*, 2007).

Plusieurs études ont été réalisées pour tenter de mettre en évidence le rôle éventuel sur la fertilité masculine des polymorphismes dans le gène *MTHFR*. Ainsi, il a été démontré que 20% des hommes consultant pour infertilité se révélaient être homozygotes pour le polymorphisme 677TT, soit le double de la fréquence dans la population contrôle étude (Bezold *et al*, 2001).

La fréquence du variant 677T chez des hommes fertiles et infertiles a été analysée mais les différentes études sont contradictoires en fonction des populations étudiées (Ravel *et al*, 2007).

### **2.8 Épigenétique et infertilité masculine**

L'épigenétique réfère à « un changement héritable mais réversible de l'activité du génome qui est dû à un mécanisme autre que l'altération dans la séquence primaire de l'ADN » (Jaenisch et Bird, 2003). Les modifications épigénétiques caractérisées par la méthylation de l'ADN, les modifications pos-traductionnelles des histones, et le remodelage de la chromatine sont des régulateurs importants d'un certain nombre de processus biologiques, y compris la spermatogenèse. Plusieurs gènes dans les testicules sont régis par des mécanismes épigénétiques, ce qui indique une influence directe de ces derniers sur le processus de la spermatogenèse. La revue de la littérature a suggéré un impact significatif des aberrations épigénétiques (épimutations) sur la spermatogenèse, ce qui pourrait entraîner l'infertilité masculine. Les épimutations (souvent hyperméthylations) dans plusieurs gènes, à savoir MTHFR, PAX8 (Paired Box 8), NTF3 (Neurotrophin 3), HRAS (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog), IGF2 (Insulin-like Growth Factor 2), H19 (Imprinted maternally expressed transcript), RASGRF1 (Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1),

PLAG1 (Pleiomorphic Adenoma Gene 1), MEST (Mesoderm Specific Transcript), KCNQ1 (potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1) et SNRPN (Small Nuclear Ribo Nucleo protein Polypeptide N), ont été rapportés en association avec des paramètres spermatiques diminués ou avec une infertilité masculine. Les toxines environnementales / médicaments peuvent affecter la fertilité par l'intermédiaire de modifications épigénétiques. Par exemple, la 5-aza-20-désoxycytidine, un agent anticancéreux, provoque une diminution de la méthylation de l'ADN globale qui mène à une morphologie altérée des spermatozoïdes, une diminution de la motilité, diminution de la capacité de fécondation et une diminution de la survie des embryons.

Les changements épigénétiques, à la différence des aberrations génétiques, peuvent être moins nuisibles parce qu'ils sont potentiellement réversibles. D'autres recherches pourraient identifier certains médicaments capables d'inverser les changements épigénétiques (Rajender *et al*, 2011).

### **2.8.1 La méthylation d'ADN**

Les profils de méthylation des résidus cytosine dans les dinucléotides CpG transmettent des informations épigénétiques importantes à propos de l'expression des gènes. En 1987, Gardiner-Garden et Frommer ont défini un îlot CpG comme une longueur de 200 paires de bases de l'ADN avec une teneur en G+C de 50% ou plus. Les îlots CpG ont été trouvés près des promoteurs (Bird *et al*, 1995), ce qui suggère qu'ils jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. En effet, l'hyperméthylation de l'ADN dans les îlots CpG est associée avec le maintien de la suppression du gène, tandis que l'hypométhylation dans ces régions est associée à l'expression du gène (Biermann et Steger, 2007).

### **2.8.2 Les modifications des histones**

Les modifications post-traductionnelles des histones sont essentielles pour une fonction cellulaire adéquate. Les extrémités N-terminales des histones contiennent des résidus d'acides aminés qui sont touchés par des : méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination et sumoylation. La somme de ces modifications et les informations qu'ils communiquent est appelée code histone.

La méthylation est l'une des modifications post-traductionnelles les plus répandues des histones. Elle est assurée par des histones méthyltransférases (HMTases) et est généralement associée à une suppression génique. Cependant, dans certains cas, la méthylation des résidus arginine et lysine peut conduire à une activation des gènes (Noma *et al*, 2001).

L'acétylation des histones est associée à des niveaux accrus de transcription et est modulée par les deux enzymes : Histones Acétyles Transférases (HATs) et les Histones DésAcétylases (HDAC). HATs activent l'expression des gènes, alors que les HDAC l'inhibent (Berger *et al*, 2002).

La phosphorylation des histones se produit sur les résidus sérine et conduit généralement à une activation des gènes (Berger *et al*, 2002).

Les modifications covalentes des histones par ubiquitination des résidus lysine peuvent provoquer l'expression génique et la répression. Par exemple, l'ajout de l'ubiquitine à l'histone H2A est lié à une inactivation génique (Baarends *et al*, 2003) alors que l'ubiquitination d'H2B est liée à l'activation de gènes (Zhu *et al*, 2007).

### **2.8.3 Remodelage de la chromatine**

Contrairement aux deux processus épigénétiques décrits précédemment, le remodelage de la chromatine n'est pas basé sur des interactions covalentes. Les complexes de remodelage de la chromatine ATP dépendants utilisent l'énergie à partir de l'hydrolyse de l'ATP pour altérer la localisation et/ou la structure du nucléosome. Ces changements dont les gènes sont disponibles pour la transcription et peuvent conduire à une expression ou à une désactivation d'autres gènes (Narlikar *et al*, 2002).

En résumé, ces modifications pourraient entraîner des changements dans l'expression des gènes impliqués dans la spermatogenèse.

# *Méthodologie*

## **1. Patients et témoins**

### **1.1 Recrutement des patients**

Les patients inclus dans notre étude sont des hommes infertiles recrutés au niveau du laboratoire d'analyse médicale « Ibn Sina » et du centre de reproduction médicalement assistée « Ibn Rochd ». Deux types de patients infertiles ont été pris en compte : les hommes présentant une azoospermie non obstructive d'une part et d'autre part les hommes infertiles présentant une oligospermie.

Ces patients ont signé un consentement éclairé et répondent à la définition de l'infertilité d'origine sécrétoire (Annexe V).

Notre étude s'est étendue du Mai 2009 à Mai 2012

#### **1.1.1 Critères d'inclusion**

Les patients ayant une azoospermie ou une oligospermie d'origine sécrétoire avec ou sans hypogonadisme (FSH élevé, LH élevé ou normal), c'est-à-dire présentant une atteinte testiculaire, sont inclus dans cette étude. Au total 80 patients ont été recrutés.

#### **1.1.2 Critères d'exclusion**

- Infertilité d'origine obstructive.
- Cryptorchidie.
- Infection.
- Varicocèle.
- Infertilité d'origine immunologique

### **1.2 Recrutement des témoins**

20 volontaires fertiles ont été recrutés, âgés de 25 à 55 ans.

Les 84 témoins utilisés dans l'étude du polymorphisme de la MTHFR ont été pris à partir de la banque d'ADN du laboratoire de biologie et génétique moléculaire.

#### **1.2.1 Critères d'inclusion**

- basées sur des paramètres spermatiques normaux selon les critères de l'OMS
- une fertilité prouvée avec un enfant déjà né.

Au total, 184 échantillons ont été obtenus. Le groupe d'étude d'hommes infertiles a été subdivisé en deux sous-groupes : les patients avec une absence totale de

spermatozoïdes dans l'éjaculat « azoospermie » (n= 49) et les patients avec une numération des spermatozoïdes inférieure à 20 millions par millilitre (n = 31).

## **2. Méthodes**

### **2.1 Analyse hormonale**

Le dosage des paramètres hormonaux :FSH, LH et testostéronea été effectué sur un automate au niveau du laboratoire IbnSina(COBAS 6000 ROCHE DG, ELECSYS 2010 ROCHE ET AXSYM ABBOTT) et au niveau de la clinique Ibn Rochd. Les normes pour cesparamètres sont mentionnées dans l'annexe.

### **2.2 Étude cytogénétique**

#### **2.2.1 Le carvotype**

Le caryotype est une analyse de l'ensemble des chromosomes, après classement. Il permet l'identification et le classement des chromosomes d'un individu et la détection d'anomalies de nombre et de structure.

Le caryotype constitutionnel réalisé à partir de lymphocytes sanguins consiste en :

#### ➤ **Culture Cellulaire**

Une mise en culture de lymphocytes à partir de prélèvement de sang total recueilli stérilement sur héparine est réalisée. La division des lymphocytes est stimulée par un agent mitogène. L'agent mitogène utilisé est une lectine, la phytohémagglutinine (PHA).

La culture cellulaire se fait en respectant des conditions précises de température, pH, CO<sub>2</sub>, humidité, stérilité, ainsi qu'un milieu de culture adéquat.

Le milieu de culture utilisé est le RPMI ou TC 199, complémenté par des nutriments etdes additifs nécessaires pour la croissance cellulaire, comme :

- le sérum de veau foetal« SVF » ;
- les antibiotiques.

#### ➤ **Obtention des métaphases**

##### **- Traitement par Colchicine ou Colcémide**

Après 72 heures de culture, les lymphocytes activés sont bloqués en métaphase par l'adjonction de colchicine (un poison du fuseau mitotique, bloquant les cellules en métaphase), pendant 1h :30 min à 37°C.

### - **Choc hypotonique**

Les cellules récupérées après centrifugation sont traitées par une solution hypotonique de KCL à 0,075M, préchauffée à 37°C. Le passage d'eau à l'intérieur de la cellule par osmose permet de gonfler les cellules, laissant ainsi plus de place aux chromosomes pour bien s'étaler.

### - **Fixation**

Fixation des cellules par la solution Carnoy (1 volume d'acide acétique glacial pour 3 volumes de méthanol). Elle est répétée trois fois (préfixation suivie de deux autres fixations)

La préfixation est obtenue par ajout de 1ml de fixateur. Après centrifugation (1500t/min) suivent 2 fixations : addition de solution Carnoy/ incubation 20 min / centrifugation et décantation.

Les cellules sont ainsi prêtes à l'étalement ou à une conservation à +4°C.

### - **Étalement**

-On laisse tomber des gouttes de la suspension obtenue sur des lames.

-Séchage des lames avec examen parallèle au microscope après coloration au Giemsa.

### - **Remarque**

L'étalement est sensible à plusieurs variables : température, humidité, technique de séchage et qualité du choc hypotonique.

### ➤ **Marquages chromosomiques**

La technique de marquage en bandes permet de reconnaître les différents chromosomes et d'identifier les anomalies de structure. Sur chaque chromosome, se présente une alternance de bandes transversales claires et sombres, reflet des variations de la structure des chromosomes. Toute variation dans cette alternance peut représenter une modification génomique.

Les deux principales techniques de marquage en bandes des chromosomes utilisées en routine sont : les bandes G (Figure 11) et les bandes R (Figure 12).

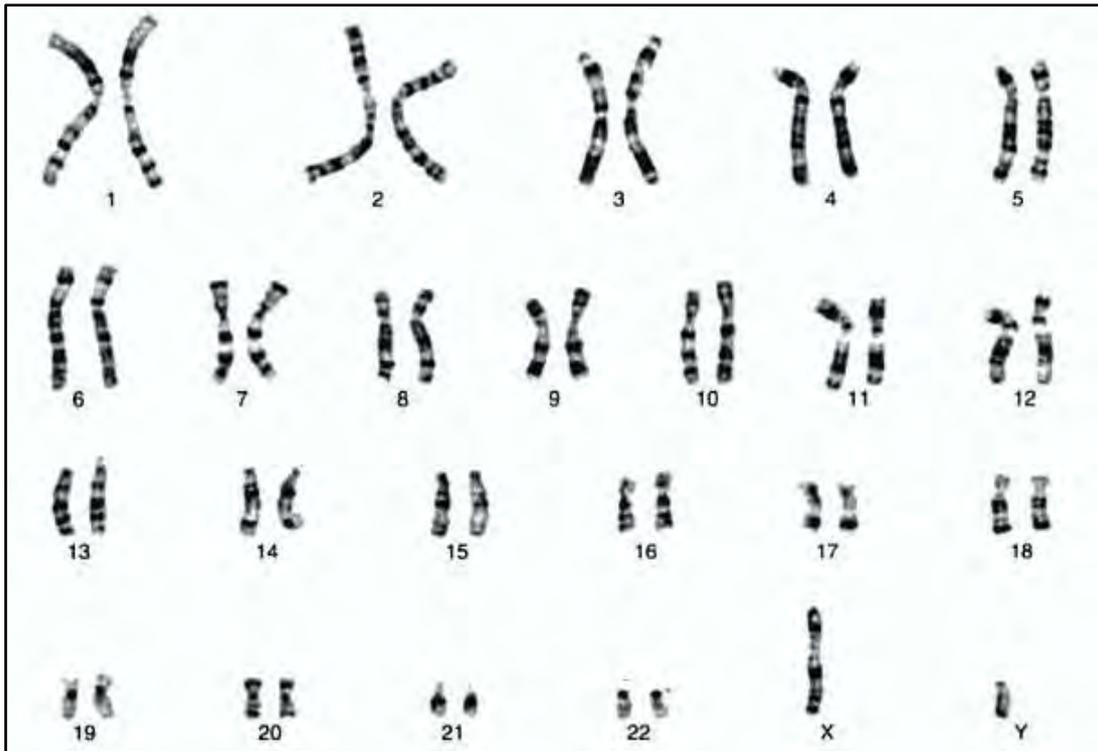


Figure 11 :Caryogramme 46, XY en bandes G (résolution 400 bandes)(Egea,2010)

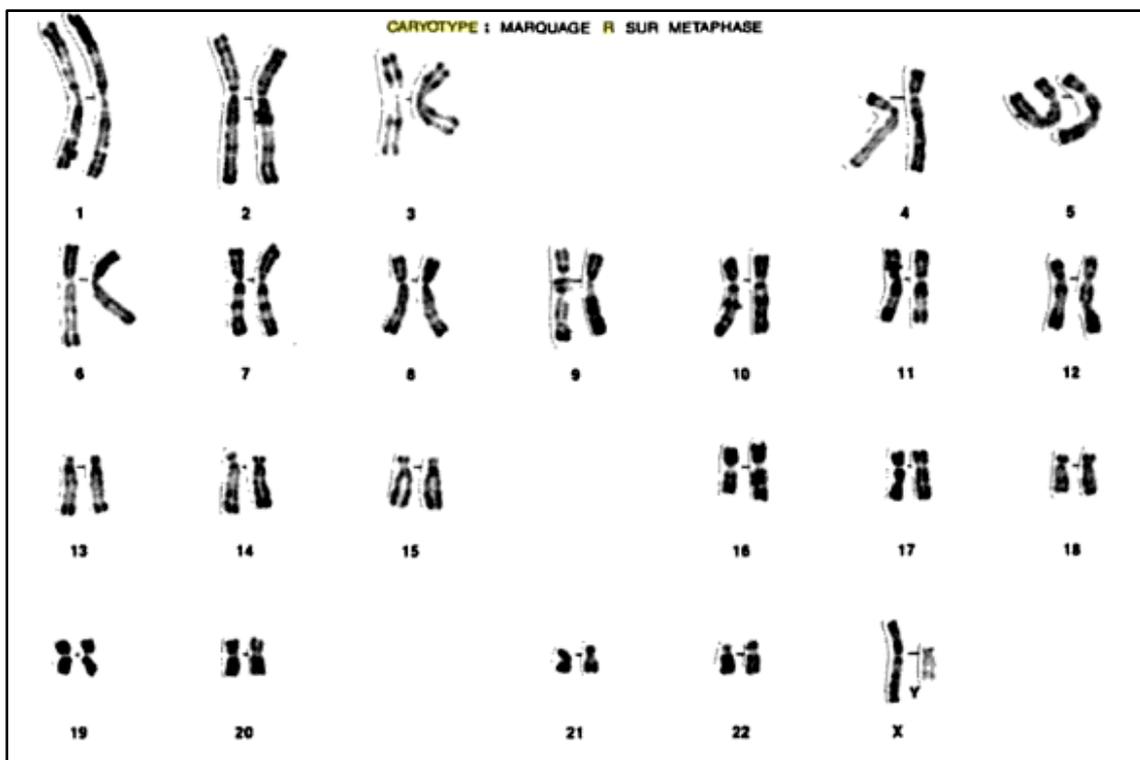


Figure 12 : Caryogramme 46,XY en bandes R (résolution 400 bandes) (Kremp, 2007)

### - **Caryotypes en bandes GTG (Bandes G, Trypsine, Giemsa)**

Une solution de trypsine à 0,25% est préparée dans le PBS (Phosphate Buffer Salt). Les lames sont plongées dans cette solution pendant 10 à 45 secondes à la température ambiante, rincées au PBS et colorées au Giemsa.

### - **Caryotype en bandes RHG (Bandes R, Heat, Giemsa)**

Les préparations chromosomiques sont traitées dans un milieu physiologique à pH 6,5 à 87°C. Ce milieu physiologique est la solution de Earle qui peut être fournie prêt à l'emploi ou être préparée extemporanément au laboratoire (Annexe VII).

Cette solution a un pH de 5,2 qui est ajusté à 6,5 par addition de cristaux de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . La solution est portée à 87°C au bain-marie. La température est un paramètre critique de la technique.

- Pour les lames étalées le même jour, les plonger dans la solution pendant 1 à 2 heures.
- Pour des lames vieilles de 8 jours les plonger pendant 15 à 45 minutes.
- À l'eau courante, rincer rapidement les lames à la fin du traitement.
- Colorer au Giemsa.

Les étalements métaphasiques ont été analysés au microscope optique (Zeiss) connecté à un ordinateur équipé d'un logiciel d'analyse chromosomique (ASI DATA BASE). Quinze métaphases ont été analysées et caryotypées (classées), et cinq métaphases supplémentaires ont été comptées pour chaque patient.

## **2.3 Étude moléculaire**

### **2.3.1 Extraction d'ADN à partir de sang total (Annexe VIII)**

Le sang des patients est prélevé (5 à 10 ml) sur anticoagulant (EDTA), par ponction veineuse.

#### ➤ **Principe**

- **La Lyse** : une lyse cellulaire est réalisée en présence de solution de lyse (Annexe V), de protéinase K et de détergent SDS (Sodium Dodécyle Sulfate). Les éléments figurés du sang, dont les leucocytes sont lysés.

- **Extraction** : l'ADN nucléaire est libéré dans le lysat et les protéines qui lui sont associés sont digérés et éliminés par précipitation au NaCl.

- **Lavages** : la pelote d'ADN est formée dans le surnagent par précipitation avec l'éthanol pur. L'ADN est ensuite solubilisé en phase aqueuse (eau stérile bidistillée).

- **Détermination de la pureté d'ADN** : les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximum en UV à 260nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN. La mesure de la densité optique de chaque échantillon à 260nm et 280nm est établie. Le rapport DO260 /DO280nm doit être compris entre 1.8 et 2, afin de pouvoir considérer que l'ADN est pur.

### **2.3.2 Recherche des microdélétions du chromosome Y**

Tous les patients et les témoins recrutés ont été testés pour les marqueurs analysant la région AZF : sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255, ainsi que SRY 272 par PCR directe.

Les séquences des primers et les conditions d'amplification sont répertoriées dans le tableau 2 :

**Tableau 2: Séquences des amorces utilisées pour la recherche de microdélétions du chromosome Y et conditions d'amplification.**

	STS Y	Séquences des amorces	Dénaturation	Hybridation	Élongation	Cycles
<b>AZF a</b>	<b>sY 84</b>	F 5' AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT 3' R 5' GCCTACTACCTGGAGGCTTC 3'	95°C, 30s	60°C, 30s	72°C30s	35
	<b>sY 86</b>	F 5'GTGACACACAGACTATGCTTC 3' R 5' ACACACAGAGGGACAACCCT 3'	95°C, 30s	60°C, 30s	72°C, 30s	35
<b>AZF b</b>	<b>sY 127</b>	F 5'GGCTCACAAACGAAAAGAAA R 5' CTGCAGGCAGTAATAAGGGA 3'	95°C, 30s	56°C, 30s	72°C, 30s	37
	<b>sY 134</b>	F 5'GTCTGCCTCACCATAAAACG 3' R 5' ACCACTGCCAAAACCTTCAA 3'	95°C, 30s	56°C, 30s	72°C, 30s	37
<b>AZF c</b>	<b>sY 254</b>	F 5'GGGTGTTACCAGAAGGCAAA 3' R 5' GAACCGTATCTACCAAAGCAG 3'	95°C, 30s	58°C, 30s	72°C, 30s	35
	<b>sY 255</b>	F 5'GTTACAGGATTCGGCGTGAT 3' R 5' CTCGTCATGTGCAGCCAC 3'	95°C, 30s	58°C, 30s	72°C, 30s	35
	<b>SRY 272</b>	F 5'CTCTAAGTATCAGTGTGAAACGGGG 3' R 5' CGAAGCGGGATCTGCGGGAAGCGGG 3'	95°C, 30s	58°C, 30s	72°C, 30s	35

### ➤ Réactifs utilisés pour la PCR

#### - Les enzymes

L'enzyme Taq DNA Polymérase (Kit Biotin) est utilisée à une concentration de 5 U/μl. La Taq polymérase est extraite de la bactérie *Thermophilus aquaticus*, elle est thermorésistante, sa température optimale d'action est de 72°C. C'est une enzyme capable d'associer des nucléotides en polymère d'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

#### - Les tampons

On utilise 1 μl de tampon pour un volume final de 10 μl par tube de PCR. Le tampon de la Taq « Biotin » nommé 10X NH<sub>4</sub> Reaction Buffer est composé de : 160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris-HCL (pH 8.8 à 25°C), 0.1% stabilizer.

#### - Les oligonucléotides

Les dNTP (DésoxyNucléotides-TriPhosphates) sont composés de : dATP, dTTP, dGTP, dCTP. Ce sont les éléments de bases utilisés par la Taq polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires lors de l'élongation. La concentration de la solution stock est de 25mM pour chaque base. La concentration finale de chaque base dans la réaction de PCR est de 0.2.

#### - Le MgCl<sub>2</sub>

Il s'agit d'un cofacteur pour la Taq polymérase. Il est utilisé à une concentration stock de 50 Mm.

### ➤ Protocole

#### - Généralités

La réaction de PCR comporte trois étapes qui se dérouleront à des températures différentes de façon cyclique. Le procédé s'effectue en une trentaine de cycles:

**La dénaturation** : les molécules d'ADN sont dénaturées par chauffage de quelques minutes à 94 ou 95°C ce qui provoque la rupture des liaisons hydrogènes et donc la séparation des deux chaînes complémentaires.

**L'hybridation** : La température est rapidement abaissée à 55-60°C environ (selon l'amorce utilisée) pendant 15 à 30 secondes. Les amorces s'hybrident chacune sur leur brin d'ADN cible grâce à l'appariement des bases complémentaires.

**L'élongation** : la température est augmentée à 72°C pendant le temps nécessaire à la Taq polymérase pour ajouter des nucléotides aux amorces hybridées, dans le sens 5'

vers 3'. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice.

Les cycles se succèdent rapidement. Les premiers fragments recherchés appelés amplicons sont présents dans le milieu. Ainsi chaque cycle permet de synthétiser autant de brins complémentaires que de brins cibles présents dans l'échantillon.

La réaction s'effectue à l'aide de thermocycleurs : Eppendorf ou Techne.

- **Préparation du mélange réactionnel de la PCR (QSP 10µl) :**

**Tableau 3 : Composants du mélange réactionnel de PCR pour la région AZF**

Mix	Vol (µl)/tube de PCR
H <sub>2</sub> O	4,02
MgCl <sub>2</sub> à 1,5 final (50mM)	0,3
Amorce sens (100 ng/µl)	1
Amorce anti-sens (100 ng/µl)	1
Tampon 10X	1
Taq DNA 5U/µl	0,08
dNTP 0,2 final	1,6
DNA 20 à 50 ng/µl	1

- **Migration électrophorétique et révélation de la PCR**

Un gel d'agarose à 2% est préparé (2 g d'agarose dans 100 ml de TBE 1X) (Tris Borate, EDTA) (Annexe IX) pour des fragments de taille de 300 à 800 pb.

Une goutte de solution de bromure d'éthidium (BET), substance intercalante s'interposant entre les bases d'acides nucléiques et rendant l'ADN fluorescent sous UV est ajouté au gel d'agarose.

Le gel est immergé dans la cuve d'électrophorèse contenant le tampon TBE 1X. 10µl du produit de PCR sont déposés dans les puits avec 2 µl de tampon de charge (Bleu de bromo-phénol) ; ce tampon de charge alourdit les fragments et permet de repérer le front de migration (120 V pendant 1h).

Un marqueur de poids moléculaire 100pb (Invitrogen) est utilisé (10 µl de la solution) pour déterminer approximativement la taille des fragments.

Après migration, le gel est visualisé sous lumière ultraviolette.

### 2.3.3 Génotypage de la Méthylènetétrahydrofolate réductase

La méthode pratiquée est la PCR/digestion

#### ➤ PCR/Digestion

#### - Amorces

Sens :5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'

Anti sens :5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'

#### - Préparation du mix PCR (QSP 50µl) :

**Tableau 4 : Composants du mélange réactionnel de PCR pour la MTHFR**

Mix	Vol (µl)/tube de PCR
H2O	35,2
MgCl2 (25mM)	5
Amorce sens C677T (8 picomol/µl)	0,2
Amorce anti-sens C677T (8 picomol/µl)	0,2
Tampon PCR 10X	5
Taq DNA 5U/µl	0,4
dNTP 2 Mm	5
DNA 250 ng/µl	2

**Tableau 5 : Programme d'amplification PCR de la MTHFR**

	Température (°C)	Temps (min)
Dénaturation initiale	94	5
	30 cycles	
	Température (°C)	Temps (sec)
Dénaturation	94	30
Hybridation	65	30
Élongation	72	40
	Température (°C)	Temps (min)
Élongation	72	10

#### - **Électrophorèse**

Dépôt de 10 µl sur gel d'agarose à 2 %, migration à 120 V pendant 1h et révélation sous UV.

### - Préparation de la digestion

Les fragments d'ADN amplifiés sont soumis à une digestion enzymatique clivant les molécules à des endroits précis appelés sites de restriction. Toute modification par mutation dans la séquence du site de restriction pourrait entraîner ou empêcher l'action de l'enzyme. Ces modifications de l'ADN sont détectées par des variations du nombre et de la longueur des fragments de restriction obtenus après digestion enzymatique.

**Tableau 6 : composants du mélange de la digestion**

Mix	Vol (µl)/tube de digestion
Produit de PCR	30
H <sub>2</sub> O	4
Tampon Enzyme 10X	5
Enzyme de restriction HINF 1	1
BSA	0,2

Les tubes de digestion sont incubés à 37 °C pendant une nuit, 20min à 80°C.

### - Électrophorèse

Dépôt de 20 µl sur gel d'agarose à 2,5%.

Migration 100 V pendant 2h dans TBE 1X et révélation par BET sous UV.

**Tableau 7 : Génotypage de la MTHFR**

MTHFR	Génotypage	Longueur du fragment pb
Homozygote sauvage	CC	198
Homozygote muté	TT	175
Hétérozygote	CT	198 +175

### **2.3.4 Séquençage du gène NR5A1 (SF1)**

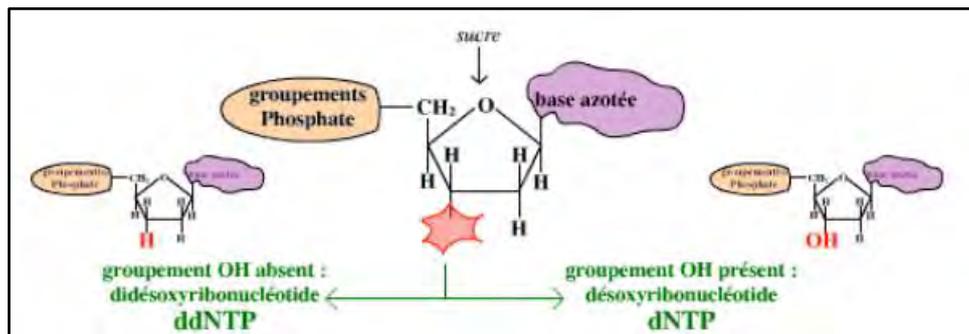
Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné.

Pour réaliser le séquençage il faut :

- amplifier le gène d'intérêt par PCR à partir de l'ADN extrait ;
- purifier le produit de PCR ;
- réaliser une PCR séquence (Marquage du fragment purifié).

➤ **Principe :**

Les techniques de séquençage utilisent des oligonucléotides particuliers : les didéoxyribonucléotides (ddNTP). Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH bien précis (Figure 13). En effet, lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.



**Figure 13 :** Schémas des deux types de nucléotides triphosphates

➤ **Amplification du gène**

L'amplification par PCR des séquences du gène NR5A1 a été réalisée avec des conditions et des amorces décrites ci-dessous.

➤ **Préparation du mix de PCR** (QSP 10µl)

**Tableau 8 :** Mélange réactionnel pour la PCR du gène NR5A1

Mix	Volume (µl)/tube de PCR
dNTP 0,2 final	1,6
Tampon 10X	1
Amorce sens (100 ng/µl)	1
Amorce anti-sens (100 ng/µl)	1
MgCl <sub>2</sub> à 1,5 final (50mM)	0,3
TaqDNA 5U/µl	0,08
Bétaine	1,2
H <sub>2</sub> O	2,82
DNA 20 à 50 ng/µl	1

**Tableau 9 : Séquences d'amorces et conditions d'amplification des exons du gène NR5A1.**

Exons	Séquences des amorces	Températures d'amplification	Nombre de cycles
Exon 1	F : 5'GGGCACAGAGAGGGGATTAC 3' R ; 5' CTGCGGGGAGCTGAGAGTC 3'	95° 5 min  95° 30 sec 64° 30 sec 72° 30 sec  72° 4 min	37
Exon 2	F : 5' ATTCGTACGACGAGGACCTG 3' R : 5'CGAAGGCCAATGGTACTATCC 3'		
Exon 3	F :5'GTGTTGAGCCAGGGGAGAGAG 3' R:5'AGAGAAGGGCTCTGGGTAGC 3'		
Exon 4	F : 5'GTGTTGAGCCAGGGGAGAGAG 3' R : 5'AGAGAAGGGCTCTGGGTAGC 3'		
Exon 5	F : 5'TCTGAGTACCCGGAGCCTTA 3' R : 5' CTCTGGCTGTCTCCACCTCT 3'		
Exon 6	F : 5' ATGCCATGTCTTTGATGGT 3' R : 5'GGTGGGCATCAGAAAATGAA 3'		
Exon 7	F : 5' ATCTGGGTAGATGGGCACAAG 3' R : 5' GTGGGAAAGGGTGATAAT 3'		

➤ **Électrophorèse de révélation**

Dépôt de 4 µl du produit amplifié (mélangé à 2 µl de bleu de bromo-phénol) sur gel d'agarose à 2%.

Migration à 100 V pendant 45 min dans le TBE 1X.

➤ **Purification enzymatique du produit de PCR**

Pour la purification rapide des produits de PCR, une combinaison de deux enzymes, l'exonucléase I et la phosphatase alcaline, a été utilisée. L'exonucléase I catalyse l'élimination des nucléotides de l'ADN simple brin de 3' vers 5',

dégrader l'excès des amorces simple brin à partir du mélange réactionnel contenant des produits d'extension double brin. La phosphatase alcaline catalyse l'élimination des groupes phosphate en 5' de l'ADN et la suppression des dNTP non incorporés.

**Tableau 10 : Purification du fragment amplifié : QSP 10 $\mu$ l**

Mix	Volume ( $\mu$ l)	Conditions de purification
Produit de PCR	4	37° C 40 min 80° C 20 min
Phosphatase alcaline	0,5	
Exonucléase I	0,25	
Eau	5,25	

➤ **Séquencage du produit de PCR purifié**

**Tableau 11 : Marquage du produit de PCR purifié(QSP 10 $\mu$ l final)**

	Volume ( $\mu$ l)	Conditions de la PCR séquence	Cycles
PCR /exo-pal	2	95° 1min	1
Buffer 5X	2	96° C 10 sec 50° 5 sec 60° C 4 min	25
Primer (3,2pmol/ $\mu$ l)	0,5		
Big Dye V1.1	0,5		
H <sub>2</sub> O	5		

Après la PCR séquence, les produits sont précipités comme suit :

- Ajouter à la PCR marquée (10 $\mu$ l) : 80  $\mu$ l éthanol 76% et laisser 15 à 30 min sur paillasse ou sur la glace.
- Centrifugation à 4000 tpm pendant 15 min à température ambiante.
- Retirer le surnageant en renversant la plaque rapidement et centrifuger à nouveau 1 minute à 1000 tpm à l'envers, sur un papier absorbant propre (whatman).
- Les plaques ainsi préparées sont mises dans le séquenceur après réhydratation.

➤ **Analyse des séquences**

Toutes les séquences réalisées ont été lues à l'aide du logiciel : Sequencher demo 4.7

Toutes les séquences ont été obtenues à partir de deux banques principales :

- **NCBI** : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- **Ensembl Genome Browser** : <http://www.ensembl.org/index.html>

**2.4 Analyse statistique**

Les résultats statistiques de tous les paramètres étudiés chez les patients recrutés ont été traités par Excel et par le logiciel Epi info version 6.0. Différentes méthodes, ainsi que différents tests ont été utilisés afin de déterminer :

1. s'il existe une différence significative des niveaux de FSH, LH et testostérone entre les hommes fertiles et infertiles d'une part et d'autre part entre les deux groupes d'hommes infertiles (Azoospermiques et OATS) : le test de Student : a été appliqué.

2. s'il existe une association significative entre le polymorphisme C677T de la MTHFR étudié et l'infertilité masculine : ceci se fait par la comparaison du nombre de fois où l'allèle est observé chez les patients par rapport au nombre de fois où il est présent chez les contrôles (test de  $\chi^2$  et calcul de l'odds ratio (OR)).

➤ **Calcul de l'odds ratio**

Pour calculer l'odds ratio nous avons établi un tableau de contingence croisé 2x2 (Tableau ci-dessous).

**Tableau 12 : Tableau de contingence**

	<b>Patients</b>	<b>Contrôles</b>	<b>Total</b>
<b>Présence du facteur présumé de risque de maladie</b>	a	b	a+b
<b>Absence du facteur présumé de risque de maladie</b>	c	d	c+d
	a+c	b+d	a+b+c+d

➤ **P value**

Pour tous les calculs, deux groupes de valeurs ont été considérés comme significativement différents si  $p < 0,05$ .

# *Résultats*

## 1. Caractéristiques principales des patients

Parmi les 80 hommes infertiles recrutés, 49 hommes étaient azoospermiques et 31 hommes oligo-asthéo-tératozoospermiques. Ces patients ont été classés en fonction de modifications détectées dans le spermogramme (Tableau13), basés sur les critères de l'OMS.

**Tableau 13 : Classification des patients selon les concentrations spermatiques.**

<b>Patients OATS (n =31)</b>	<b>Nombre de patients</b>
Concentration spermatiques( $\times 10^6$ SPZ/ml)	
0,1 - 1	12
1 - 5	11
>5	8
<b>Patients Azoospermiques</b>	<b>49</b>

Les patients qui ont été inclus dans cette étude proviennent de quatre régions géographiques différentes (Centre, Est, littoral méditerranéen, Sud) et de 14 villes de l'Algérie (Tableau 14).

**Tableau 14 : Classification des patients en fonction de l'origine géographique**

<b>Ville</b>	<b>Nombre de patients</b>
M'Sila	1
Bordj Bou Arreridj	1
Sétif	1
Mila	9
Constantine	46
Oum el Bouaghi	6
Khenchela	2
Batna	3
Tébessa	3
Jijel	1
Skikda	3
El Tarf	1
Biskra	2
Hassi Messaoud	1

L'âge moyen de ces hommes infertiles était de 35,46 ans avec des extrêmes allant de 24 à 48 ans. Il n'y avait pas de différence significative dans l'âge moyen des hommes avec azoospermie et OATS, on note 34,56 et 37,10 ans, respectivement  $P > 0,05$ .

**Tableau 15 : Répartition des patients par tranche d'âge**

Tranche d'âge	Fréquence	%
20 - 30	12	15
31 - 41	55	68,75
42 - 52	13	16,25
<b>Total</b>	80	100

La tranche d'âge de 31-41 ans était la plus représentée avec une fréquence de 68,75%. Ceci peut s'expliquer par l'âge du mariage qui est de plus en plus tardif.

## **2. Résultats des analyses spermatiques et hormonales**

### **2.1 L'analyse spermatique**

Une moyenne de la numération spermatique de  $3,46 \pm 1,7$  millions/ ml ( $< 1-15$  millions) à mobilité réduite ( $6 \pm 0,03$ , 0-16%) et à morphologie normale ( $22,23 \pm 3,38$  ; 14-32%) a été observée dans le groupe de patients OATS. Pour le groupe témoin, la moyenne de la numération spermatique était de  $93,1 \pm 19,62$  ( $76,8$  à  $150,7$  millions/ml) avec mobilité réduite ( $18,3 \pm 5,05$ ) et morphologie normale ( $67,8 \pm 6,85$  ; 55-86%) (Tableau 16).

**Tableau 16 : Comparaison des différents paramètres spermatiques chez les patients fertiles et infertiles.**

Groupe	pH	Paramètres spermatiques						
		Volume séminal (ml)	Concentration spermatique ( $\times 10^6$ SPZ/ml)	Mobilité			Morphologie	
				Mobilité rapide (%)	Mobilité lente (%)	Immobile (%)	Formes typiques (%)	Formes atypiques (%)
<b>Patients OAT (n=31)</b>	$7,45 \pm 0,41$ (7-9)	$2,64 \pm 1$ (1-5)	$3,46 \pm 1,7$ ( $< 1-15$ )	$6 \pm 0,06$ (0-20)	$6 \pm 0,03$ (0-16)	$88 \pm 1$ (63-100)	$22,23 \pm 3,38$ (14-32)	$77,77 \pm 3,38$ (68-86)
<b>Patients Azoospermiques (n=49)</b>	$7,37 \pm 0,06$ (7-7,5)	$2,1 \pm 1,24$ (0,5-5)	0	0	0	0	0	0
<b>Fertiles (n=20)</b>	$7,28 \pm 0,28$ (7-8)	$2,9 \pm 0,03$ (1,2-7)	$93,1 \pm 19,62$ (76,8-150,7)	$69,4 \pm 6,04$ (60-81)	$18,3 \pm 5,05$ (10-28)	$12,3 \pm 4,1$ (7-20)	$67,8 \pm 6,85$ (55-86)	$31,2 \pm 7,90$ (14-45)

**Valeurs: moyenne  $\pm$  écart-type.**

## 2.2 L'analyse hormonale

Le tableau 17 énumère les niveaux d'hormones de patients impliqués dans cette étude. Les niveaux de FSH et de LH étaient significativement plus élevés pour les infertiles avec azoospermie que celle du groupe oligoasthénoteratozoospermique ( $p=0,004$  ;  $p=0,005$ , respectivement). Cependant, pour la testostérone, il n'y avait pas de différence significative entre les deux types d'infertilité. Une différence significative de niveaux de FSH, LH et testostérone a été également observée entre le groupe d'infertiles et le groupe d'hommes fertiles ( $p=0,001$  ;  $p=0,005$  ;  $p=0,006$ , respectivement).

**Tableau 17 : Valeurs hormonales des hommes fertiles et infertiles**

	Homme fertiles	Tous les infertiles	P	Hommes infertiles avec azoospermie	Hommes infertiles avec OATS	P
N	20	80	-	49	31	-
L'âge au diagnostic (Années)	38,35 ± 6,86 (28-52)	35,46 ± 4,97 (24-48)	0,08	34,56 ± 5,56 (24-48)	37,10 ± 5,04 (28-46)	0,064
FSH (mU/ml)	5,48 ± 1,66 (2,52-8,48)	<b>14,34 ± 4,27</b> (1,24-50,01)	<b>0,001*</b>	<b>19,08 ± 11,75</b> (1,24 - 39,3)	<b>9,94 ± 3,54</b> (1,56-50,01)	<b>0,004*</b>
LH (mU/ml)	4,91 ± 1,27 (2,21-6,61)	<b>8,03 ± 2,58</b> (1,36-24,2)	<b>0,005*</b>	<b>9,91 ± 5,60</b> (2,25- 24,2)	<b>6,20 ± 2,45</b> (1,36-12,24)	<b>0,005*</b>
Testostérone (ng/ml)	7,47 ± 1,74 (4,3-11,6)	<b>3,13 ± 1,13</b> (0,28-7,04)	<b>0,006*</b>	3,54 ± 1,84 (0,28-7,04)	2,82 ± 1,13 (1,10-6,95)	0,136

\*Une différence significative entre les patients avec NOA et les patients avec OATS d'une part et d'autre part entre les fertiles et infertiles a été observée.

## 3. Résultats de l'analyse cytogénétique

Les échantillons sanguins de 80 patients ont été soumis au caryotype standard. Après traitement pour obtenir le banding G ou R, 20 métaphases sont observées, classées puis analysées pour chaque patient. Quelques photographies

représentant les caryotypes correspondant à différentes anomalies plus un cas sans anomalies apparentes sont présentées (Figures 14-23).

Le tableau 16 répertorie les résultats obtenus pour l'ensemble de nos patients.

**Tableau 18 : Différents types d'aberrations chromosomiques retrouvées chez les 80 patients infertiles étudiés**

Anomalies chromosomiques	Caryotype	Nombre de patients	Paramètres spermatiques			Analyse hormonale		
			CS (million/ml)	Mobilité %	Morphologie %	FSHmU/ml	LH mU/ml	TEST ng/ml
<b>Caryotype normal</b>	46,XY	53	/	/	/	/	/	/
<b>Caryotype Féminin</b>	46,XX	1	0	0	0	0,9	0,38	10,6
<b>Anomalies Numériques Homogènes</b>	47,XXY	3	0	0	0	24,34 ND 27,5	18,81 ND 16,56	0,28 ND 1,37
	1							
	2							
	3							
	47,XYY	1	0	0	0	ND	ND	ND
<b>Mosaïque</b>	46,XY/47,XYY	3	3,1 0 0	4 0 0	14 0 0	8,48 35,1 ND	5,48 4,01 ND	1,1 4,34 ND
	1.							
	2.							
	3.							
	46,XY/47,XXY	2	0 1-2SPZ/champs	0 0	0 0	ND 12,74	ND 5,5	ND 1,5
1.								
	2.							
<b>Culture stérile</b>		17	0-15m/ml	/	/	/	/	/

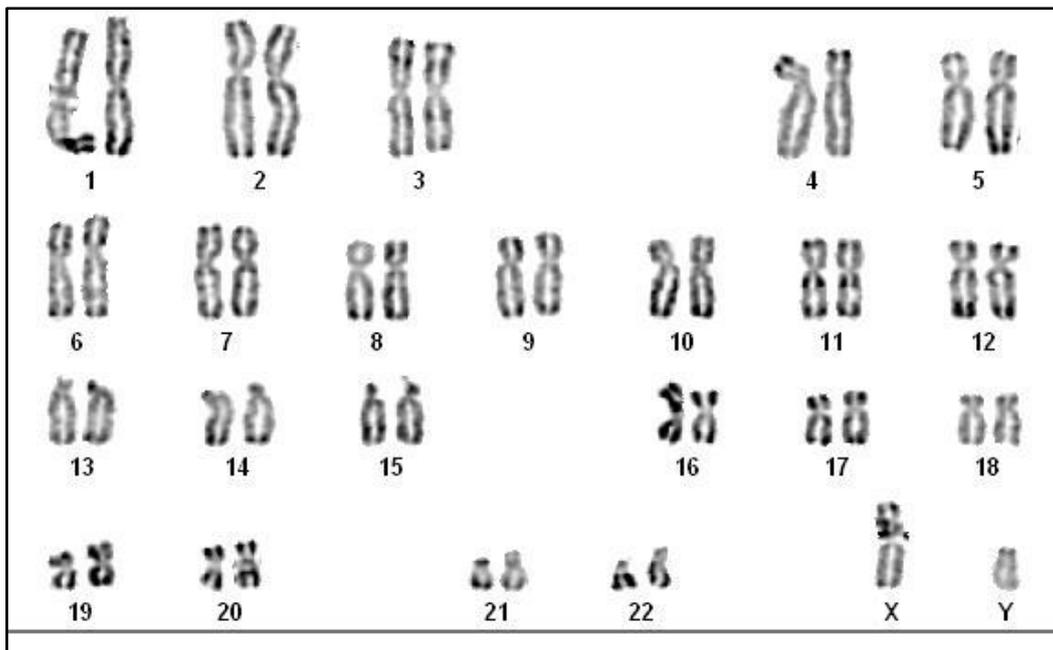
**ND** : Non disponible

**CS** : Concentration spermatique

**3.1 Cas de patient avec caryotype normal**

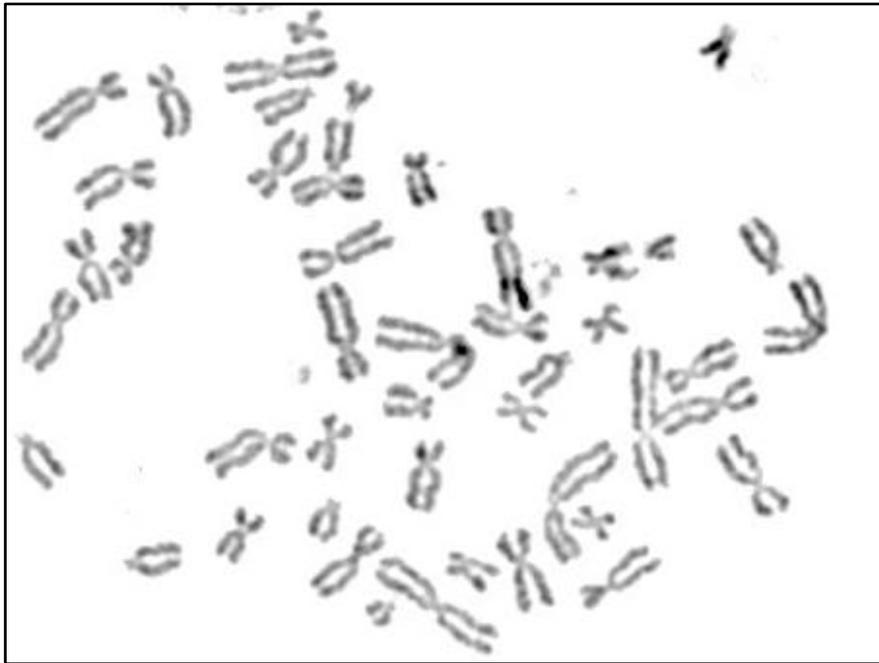


**Figure 14 :** Chromosomes métaphasiques d'un noyau cellulaire éclaté et dispersé.  
Grossissement X 100

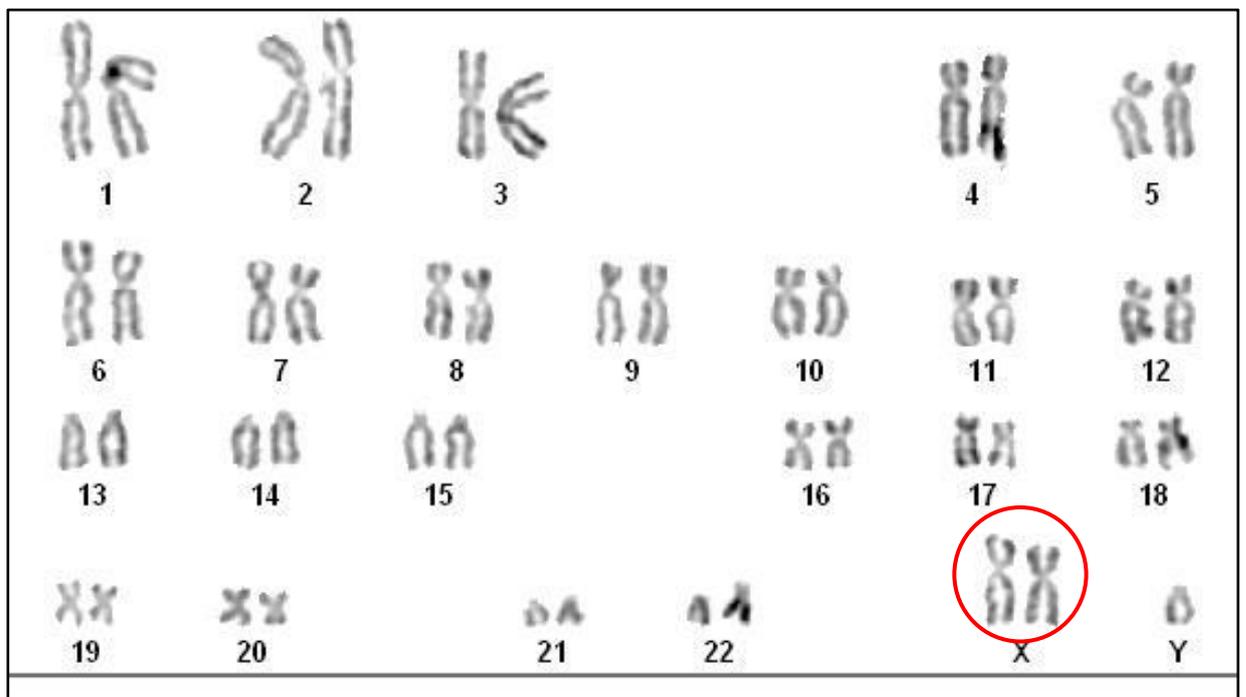


**Figure 15 :** Caryotype masculin normal 46,XY (RHG)

**3.2 Cas de syndrome de klinefelter libre et homogène**

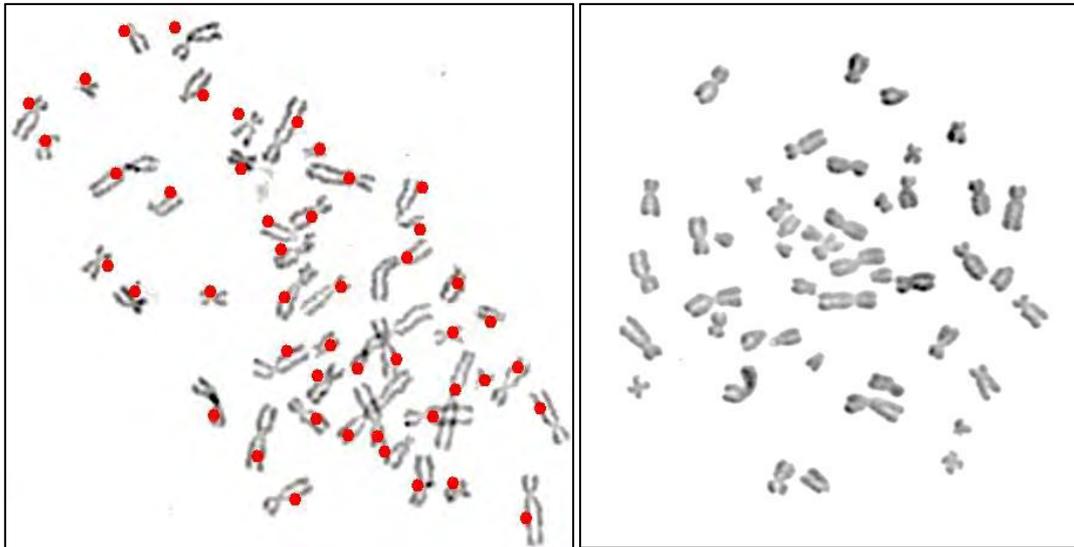


**Figure 16 :** Chromosomes métaphasiques d'un noyau cellulaire (2) éclaté et dispersé.  
Grossissement X 100

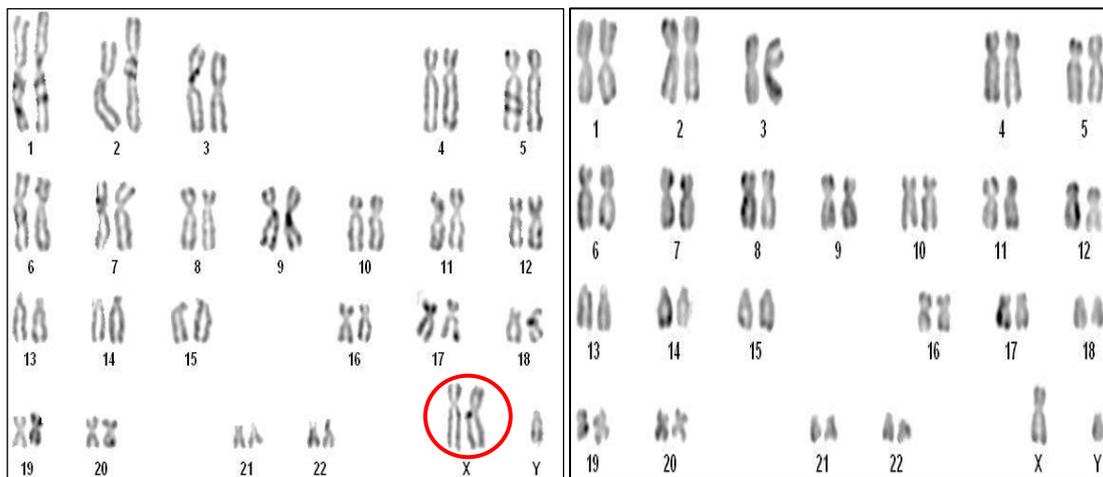


**Figure 17 :** Caryotype masculin anormal 47,XXY (coloration simple)

**3.3 Cas du syndrome de klinefelter en mosaïque**

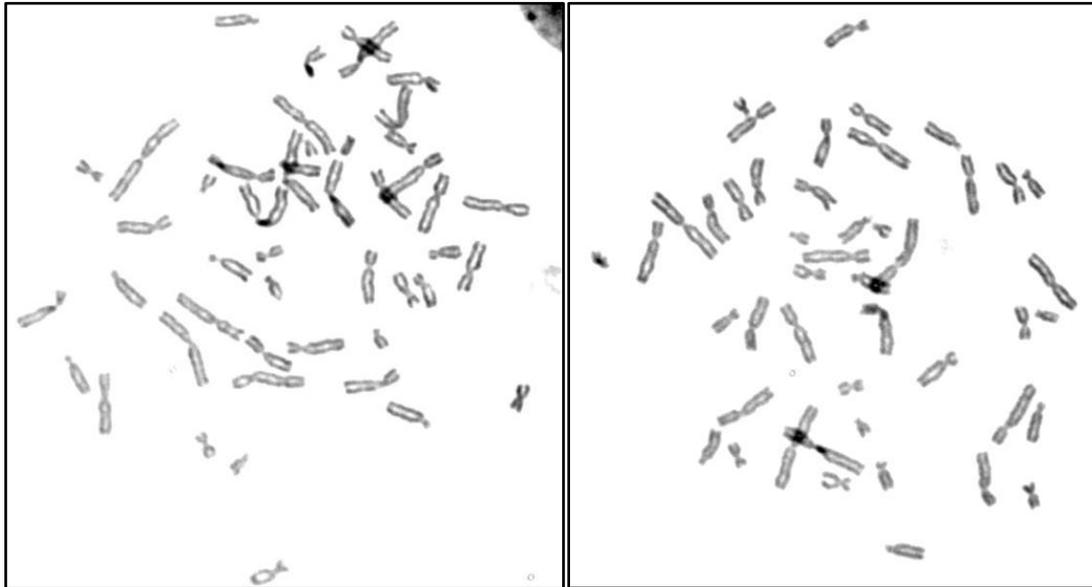


**Figure 18 :**Chromosomes métaphasiques de deux noyaux cellulaires (3) éclatés et dispersés.Grossissement X 100

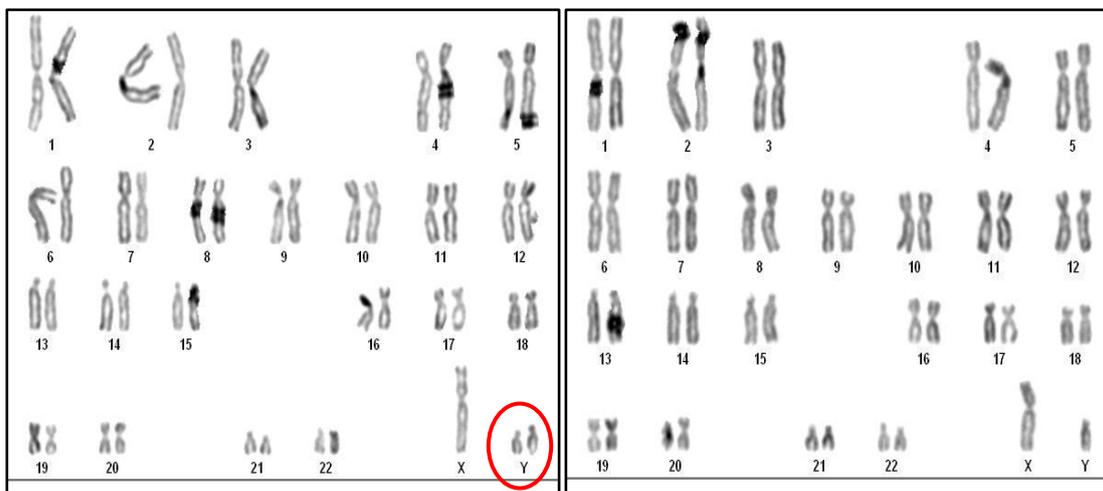


**Figure 19:** Caryotype masculin anormal en mosaïque 46,XY[25]/47,XXY [18] (coloration simple)

**3.4 Cas du syndrome de mâle 47, XYY en mosaïque**



**Figure 20 :** Chromosomes métaphasiques de deux noyaux cellulaires(4)éclatés et dispersés.Grossissement X 100



**Figure 21 :** Caryotype masculin anormal en mosaïque 46,XY[24]/47,XYY[4] (coloration simple)

3.5 Cas du mâle XX.



Figure 22 : Chromosomes métaphasiques d'un noyau cellulaire éclaté et dispersé.  
Grossissement X 100

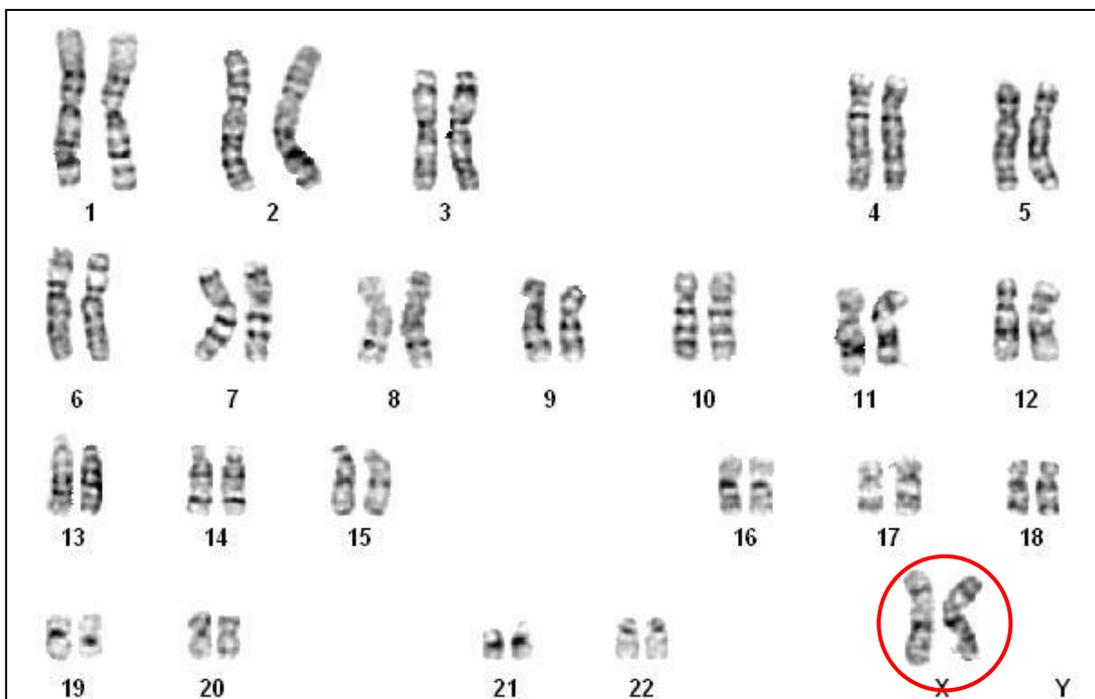


Figure 23 :Caryotype d'un homme XX 46,XX (GTG)

## **4. Résultats de l'analyse moléculaire**

### **4.1 Microdélétions du chromosome Y**

Afin d'explorer la possibilité de l'existence de microdélétions du chromosome Y, nous avons utilisé des amorces permettant de détecter les trois régions AZF (AZF a,b,c) par une PCR classique. Pour cela, l'analyse des régions AZF chez 80 patients azoospermiques ou oligozoospermiques, dont le caryotype était normal ou anormal est effectuée.

Les trois AZF loci sont explorés en utilisant les amorces STS suivants : pour AZFa-sY84 et sY86 ; pour AZFb-sY127 et sY134 ; et pour AZFc-sY254 et sY255.

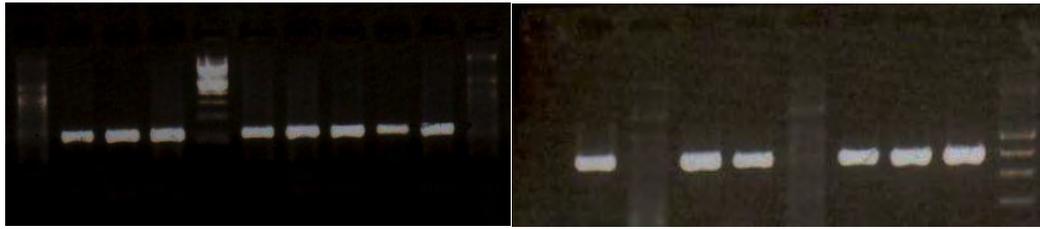
Ce jeu d'amorces a été suggéré par Simoni *et al* (1999) et est prescrit par l'Académie européenne d'andrologie et de l'European molecular genetics quality network et permet la détection de plus de 90% des microdélétions de la région AZF. Le contrôle interne qui a été utilisé est SRY 272, des échantillons d'hommes fertiles et de femmes en bonne santé, ont été utilisés comme témoins normaux. Un STS est considéré comme délété après au moins trois échecs d'amplifications indépendantes, en présence d'amplification réussie de SRY 272.

Ainsi les microdélétions du chromosome Y ont été trouvées chez un patient sur les 80 soit un pourcentage de 1,3%(1/80) de tous les hommes infertiles étudiés. Ce patient porte une microdélétion de la région AZFc (sY254 et sY255) et présente une azoospermie non obstructive.

Considérant que les patients atteints d'azoospermie, la fréquence des microdélétions du chromosome Y est 2%. Aucune microdélétion n'a été trouvée chez les contrôles fertiles et aucune amplification n'a été détectée chez la femme normale utilisée comme témoin négatif (Figure 24).

Il est à noter que le patient XX s'est avéré SRY négatif. Ceci est en faveur d'une anomalie dans la cascade des gènes impliqués dans le déterminisme du sexe.

Ci-dessous, les profils électrophorétiques des résultats obtenus.



(A) F C 1 2 M 3 4 5 6 7 8 (B) B C 8 7 6 F 5 4 3 M

sY255sY254



(C) M 6 7 8 9 C B

SRY272

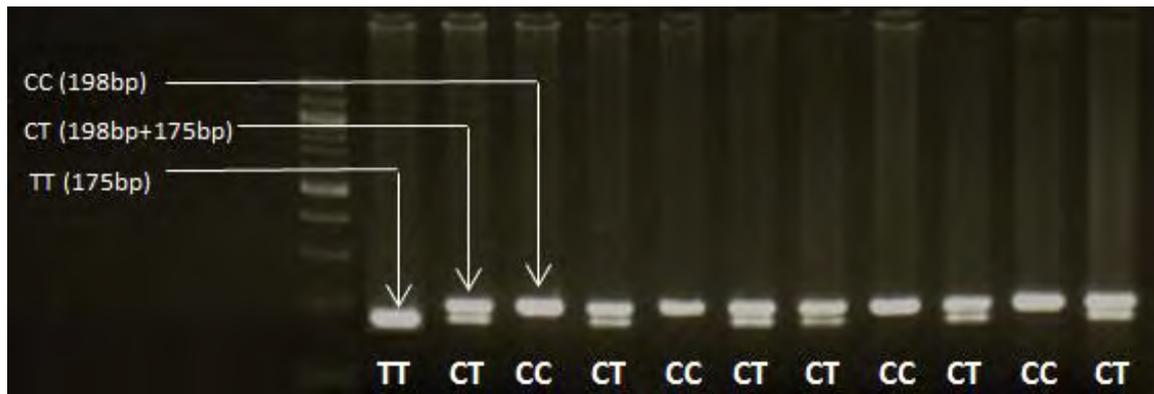
**Figure 24** : Photographie du profil électrophorétique du patient azoospermique (8) avec une délétion de la région AZFc (sY255 et sY254) : il n'y a pas de bande (A et B) et du patient 9 (SRY négatif). M, marqueur ; B, témoin négatif ; C, contrôle positif ; F, le contrôle négatif d'ADN féminin ; 1-9, les patients (Chellat *et al*, 2013).

#### **4.2 Polymorphisme C677T de la MTHFR**

Étant donné l'implication du polymorphisme de la MTHFR dans un grand nombre de pathologies et également l'infertilité masculine, nous avons recherché, une relation entre une infertilité idiopathique et des polymorphismes constitutionnels d'un gène codant pour une enzyme impliquée dans le métabolisme des folates chez des patients algériens. Nous avons ainsi étudié le variant C677T du gène MTHFR.

Le polymorphisme a été choisi parmi ceux pouvant être potentiellement délétères.

Nous avons analysé le polymorphisme du gène de la MTHFR chez 74 infertiles et 84 témoins par PCR-RFLP. Les résultats représentatifs de génotypage pour le locus C677T du gène MTHFR par électrophorèse sont représentés à la figure 25.



**Figure 25 :** Les résultats du génotypage C677T de la MTHFR.M, marqueur de taille d'ADN ;CC, type sauvage homozygote ; CT, hétérozygote ;TT, mutant homozygote (Chellat *et al*, 2012).

Les homozygotes de type sauvage (CC), les hétérozygotes (CT), et les mutants homozygotes (TT) ont montré une bande (198 pb), deux bandes (198 et 175 pb), et une bande (175 pb), respectivement, en raison de la production d'un site de coupure pour HinfI par l'allèle T.

Par ailleurs, les résultats de l'analyse statistique, pour les patients et les témoins sont résumés dans le tableau 19.

**Tableau 19 : Répartition des génotypes de la MTHFR C677T chez les infertiles (n =74) et les témoins (n =84)**

	Témoins		Hommes infertiles		OR	P
	%	n	%	n		
<b>677 CC</b>	42,86	36	42,46	31	-	-
<b>677 CT</b>	45,24	38	44,59	33	<b>1,01 (0,49-2,08)</b>	NS
<b>677 TT</b>	11,90	10	13,51	10	<b>1,16 (0,38-3,53)</b>	NS
<b>CT+TT</b>	57,14	48	58,11	42	<b>1,02(0,51-2,01)</b>	NS
<b>C allele</b>	<b>65,48</b>	<b>110</b>	<b>64,19</b>	<b>94</b>	-	-
<b>T allele</b>	<b>34,52</b>	<b>58</b>	<b>35,81</b>	<b>52</b>	<b>1,04(0,54-2,00)</b>	NS

NS : Non significatif

Nous n'avons pas trouvé d'association entre le variant de la MTHFR étudié et l'infertilité masculine. Ces données semblent indiquer que ce polymorphisme n'a pas d'impact significatif sur la numération spermatique, tout du moins dans la population ciblée étudiée.

**Tableau 20 :** Fréquence génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR selon le type d'infertilité

	<b>677CC</b>	<b>677CT</b>	<b>677TT</b>	<b>CT+TT</b>	<b>Allèle T</b>
<b>Azoospermie n=46 OR(95%IC) P</b>	43,48 % n=20 – –	41,30% n=19 0,90(0,39-2,10) 0,790	15,22% n=7 1,26(0,36-4,36) 0,682	56,52% n=26 0,98(0,44-2,15) 0,945	35,87% n=33 1,02(0,48-2,17) 0,946
<b>OAT n= 28 OR(95%IC) P</b>	39,29% n=11 – –	50% n=14 1,21(0,44-3,31) 0,687	10,71% n=3 0,98(0,18-4,97) 0,980	60,71% n=17 1,16(0,45-3,04) 0,740	35,71% n=20 1,13(0,45-2,86) 0,779
<b>Hommes Fertiles n=84</b>	42,86% n=36	45,24% n=38	11,90% n=10	57,14% n=48	34,52% n=58

Dans le tableau 20, les polymorphismes sont évalués en fonction du type d'infertilité : azoospermie (n = 46), et OAT (n = 28). La variation de l'allèle C677T ne montre aucune différence significative entre les deux groupes.

### **4.3 Séquençage du gène NR5A1**

Le facteur stéroïdogénique -1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) joue un rôle important dans le développement des glandes surrénales et la fonction de la reproduction, et les mutations de ce facteur de transcription ont été signalées en association avec l'infertilité masculine humaine.

Le séquençage de toute la région codante de NR5A1 a été réalisé sur un total de 69 hommes infertiles recrutés (Exclusion des patients porteurs d'anomalies chromosomiques « 10 » et du patient porteur de la microdélétion en AZFc). L'ensemble des mutations et de polymorphismes (NR5A1) détectés dans notre population d'étude est résumé dans le tableau 21.

**Tableau 21 :Mutations et polymorphismes NR5A1 et phénotypes associés**

Phénotype	Nombre d'individus	Nombre d'individus avec des mutations dans NR5A1	Nombre d'individus avec des polymorphismes dans NR5A1
Azoospermie	49	0	14
OAT	31	1	9

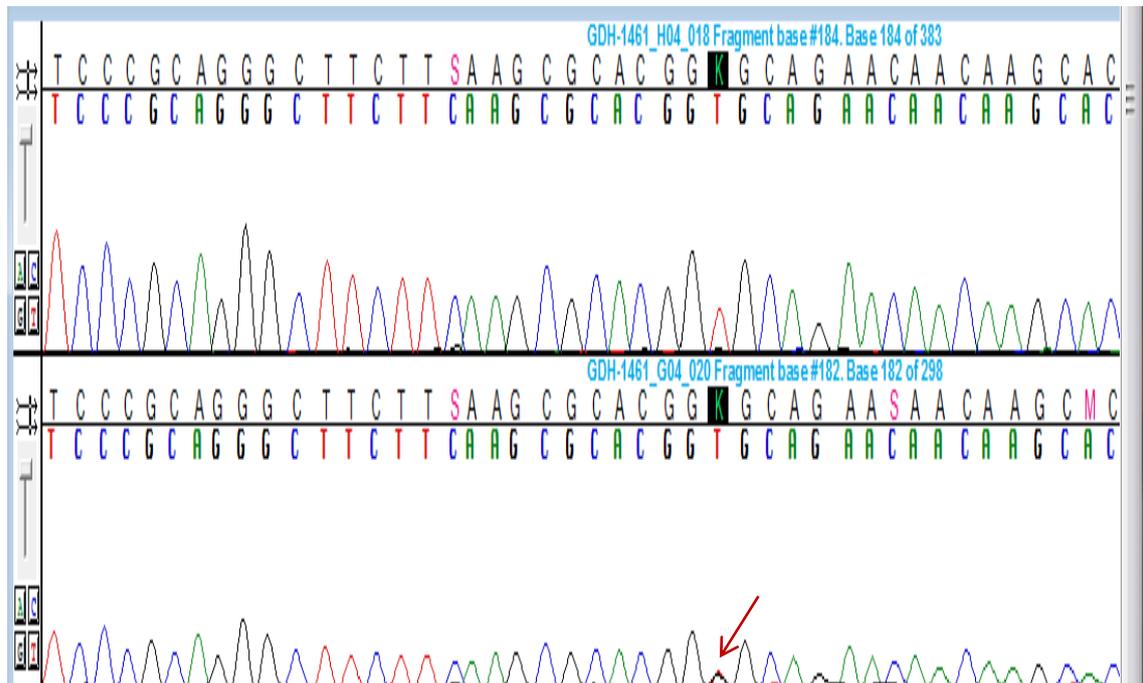
Dans cette analyse moléculaire par séquençage du gène NR5A1, nous avons trouvé une nouvelle mutation non répertoriée dans la banque de données (Ensemble Genome Browser). Cette mutation est de type faux-sens hétérozygote p.Val83Gly (c.248T>G). Cette variation du gène n'a pas été identifiée chez les témoins pour l'exclusion d'un polymorphisme du gène.

L'ensemble des résultats de séquençage ont été résumés dans le tableau 22. Des mutations silencieuses connues et non connues ont également été trouvées dans notre échantillon.

**Tableau 22 : Résultats des mutations et des polymorphismes du gène NR5A1**

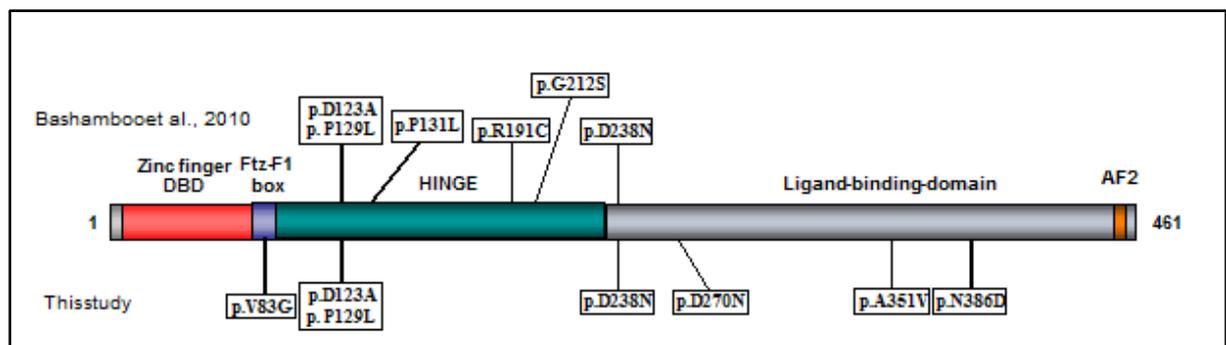
<b>Mutations dans NR5A1 associées à un défaut de la spermatogénèse</b>							
Patient	Age	Caryotype	Mutation	Concentration spermatique	FSH	LH	T
1	32	46,XY	p.Val83Gly (c.248T>G)	0.08	51.9	25.5	2.85
<b>Polymorphismes dans NR5A1</b>							
Exons	Polymorphismes		Nombre de patients porteurs du polymorphisme				
Exon 3	p.G146A c.37G>C		3				
Exon 7	c.1665 rs915034 SNP		20				
<b>Mutations silencieuses</b>							
Exons	Mutations		Nombre d'individus				
Exon 1	p.Thr29Thr c.87G>A (non connue)		1				
Exon 7	p.Leu451Leu c.1353G>A (connue)		1				

La figure 26 montre un court extrait du profil obtenu de la mutation trouvée ; nos séquençages sont en effet de bonne qualité avec parfois quelques pics parasites.



**Figure 26 : profil de séquençage obtenu (mutation Val83Gly, double pic évident pour le G4 dans l'exon 2 du gène)**

Par ailleurs, cette mutation a été introduite dans un tableau récapitulatif avec certains d'autres mutations révélées dans le laboratoire (Unité de génétique du développement humain, Institut Pasteur, Paris, France) et portant sur une cohorte constituée de patients de l'Algérie, Tunisie, Maroc et France (Figure 27).



**Figure 27 :Distribution des Mutations de NR5A1 Associées à une spermatogénèse défectueuse en relation avec la protéine (Bashamboet *et al*, Article sous presse).**

# *Discussion générale*

### DISCUSSION GÉNÉRALE

Au cours de ce travail, différents aspects génétiques de l'infertilité masculine ont été étudiés. Ainsi, plusieurs facteurs de risque potentiels, pouvant contribuer à une spermatogénèse défectueuse ont été analysés à plusieurs niveaux : biologique, cytogénétique et moléculaire.

#### - Analyses spermatiques et hormonales

Dans le groupe de patients OATS, une moyenne de la concentration spermatique de  $3,46 \pm 1,7$  millions/ ml à mobilité réduite et à morphologie typique ( $6 \pm 0,03$  ;  $22,23 \pm 3,38$ , respectivement) a été observée. Pour le groupe témoin, la moyenne de la concentration spermatique était de  $93,1 \pm 19,62$  et celle des spermatozoïdes à mobilité réduite était de  $18,3 \pm 5,05$ , et celle des spermatozoïdes à morphologie normale étaient de  $67,8 \pm 6,85$  (Tableau 16).

Nos résultats sont en accord avec ceux publiés par Andersson *et al* (2004) qui ont trouvé une moyenne de la concentration spermatique de 3,6 chez les infertiles et de 58 millions/ml chez les hommes fertiles étudiés. De ce fait, ils ont signalé une différence significative entre les deux groupes ( $P < 0,001$ ).

D'autres chercheurs se sont intéressés à la comparaison des paramètres spermatiques entre des groupes d'hommes fertiles. Ainsi, des différences significatives ont été détectées dans la qualité du sperme (Concentration spermatiques, mobilité et morphologie) entre les hommes fertiles de quatre villes européennes (Copenhague ; Paris ; Edinburg ; et Turku). Cette étude rapporte que, les finlandais avaient les plus hautes concentrations spermatiques ( $\times 10^6/\text{ml}$ ) ( $105 \pm 73$ ), suivis par les français et les écossais ( $94 \pm 72$  ;  $92 \pm 63$ , respectivement), tandis que les danois (Copenhague) avaient les plus basses qualités spermatiques ( $77 \pm 66$ ) (Jorgensen *et al*, 2002).

Des résultats comparables ont été également publiés par Iwamoto *et al* en 2006 qui ont effectué leur étude en comparant les paramètres spermatiques d'hommes fertiles japonais (Kawasaki/Yokohama) avec ceux publiés par Jorgensen *et al*.

Aleisa (2012) a réalisé une étude sur 49 hommes fertiles et 160 infertiles saoudiens et a également rapporté une différence significative dans les valeurs moyennes de la concentration des spermatozoïdes ( $116,40 \pm 57,97$  ;  $7,14 \pm 4,45$ ), la

motilité des spermatozoïdes ( $57,43 \pm 15,8$  ;  $26,47 \pm 15,4$ ) entre les hommes fertiles et infertiles (OATS), respectivement.

À partir de ces résultats, comparativement chez les Algériens fertiles, les concentrations spermatiques étaient au même niveau que celles des français et des écossais.

Les niveaux de FSH, LH et de la testostérone chez les hommes infertiles étaient significativement plus élevés que ceux chez les hommes fertiles ( $P < 0,05$ ) (Tableau 17). Nous avons également trouvé une différence significative des niveaux de FSH et LH entre les hommes infertiles avec azoospermie et les hommes infertiles avec oligo-asténo-teratozoospermie. Par contre aucune différence significative n'a été signalée pour les taux de la testostérone entre les deux derniers groupes étudiés.

Oates *et al* (2002) ont rapporté que la moyenne de la FSH chez les hommes avec oligospermie sévère était significativement inférieure à la moyenne de cette hormone chez les azoospermiques et les moyennes de LH et de la testostérone ne diffèrent pas significativement entre les deux groupes.

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.

Koşar *et al* (2010) ont aussi rapporté une différence significative des moyennes de FSH, LH et de volume testiculaire en comparant d'une part les hommes fertiles et infertiles et d'autre part le groupe de patients avec azoospermie et le groupe de patients oligospermique.

Récemment, Zhang *et al* (2012) ont observé une différence significative du niveau de la FSH entre les deux groupes étudiés (NOA et OS).

Par ailleurs, comme le montre le tableau 18, les patients porteurs d'anomalies chromosomiques présentaient des taux plus élevés de FSH et/ou de LH, et des niveaux faibles de testostérone.

Selon Kosar *et al* (2010), les niveaux plasmatiques de la FSH et de la LH ainsi que le volume testiculaire peuvent avoir des implications pronostiques sur la fonction testiculaire.

Le patient présentant la microdélétion AZFc de notre groupe d'étude montre des niveaux élevés de FSH et LH (19,8 et 9,91, respectivement) (Article sous presse).

Plusieurs études ont montré que les taux sériques de FSH étaient significativement supérieurs à la valeur moyenne chez les patients azoospermiques et chez les patients ayant des microdélétions (Krausz *et al*, 2001 ; 2003 ; Lammarrone *et al*, 2003 ; Mirfakhraie *et al*, 2003). Nous n'avons pas pu faire cette comparaison à cause du nombre insuffisant de patients avec microdélétions.

Wang *et al* (2011) ont aussi étudié la relation entre la FSH et les microdélétions AZF du chromosome Y et ont conclu que la microdélétion de AZFb+c+d est l'une des causes importantes du niveau élevé de FSH.

Il est admis aujourd'hui que la fonction des cellules de Sertoli dépend d'une stimulation adéquate par la FSH ; l'élévation des taux de celle-ci peut conduire à une spermatogenèse anormale (Lammarrone *et al*, 2003).

### - **Analyse cytogénétique**

Les facteurs génétiques les plus fréquemment liés à l'infertilité masculine sont dues à des anomalies chromosomiques dans les cellules somatiques. Ces anomalies peuvent être numériques ou structurales et peuvent impliquer les chromosomes sexuels ou les autosomes.

Bien que ces anomalies aient été reconnues comme étroitement associées à l'infertilité masculine, peu d'études dans la littérature ont accordé une attention particulière à leur prévalence. L'incidence de ces anomalies dans la population masculine infertile est d'environ 10% à 23,62% (Pina- Neto *et al*, 2006) et cette fréquence augmente à mesure que la concentration des spermatozoïdes dans l'éjaculat diminue.

La plupart de ces aberrations sauf, pour les inversions, les translocations réciproques ou robertsoniennes, ont été également détectées dans notre population d'étude. Ainsi dans la présente recherche, nous avons trouvé une incidence d'anomalies chromosomiques somatiques de 12,5% (10/80 patients), plus fréquente dans le groupe azoospermie (10%) (8/80) que dans le groupe oligospermie (2,5%) (2/80). Cette incidence élevée d'anomalies chromosomiques observée dans notre population peut s'expliquer par le faible nombre de patients infertiles analysés.

Les fréquences rapportées des anomalies chromosomiques sont de 10,00-23,62% en azoospermie non obstructive et de 1,10 à 13,33% en oligozoospermie sévère, (Zhang *et al*, 2012).

La fréquence globale observée de ces anomalies chromosomiques somatiques varie d'une recherche à une autre (Rosenbusch, 2010). Par exemple, Mau-Holzmann (2005) a rapporté un pourcentage de caryotypes masculins anormaux allant de 2,1 à 8,0% (n = 6595). Une autre revue de De Braekeleer *et al* (2006) basée sur un plus grand nombre de patients (10726) a donné un taux moyen de caryotypes anormaux de 3,6%. Par ailleurs, la fréquence des aberrations dans certaines études récemment publiées varie de 2,2% -5,2% (Kayed *et al* 2006; Marchina *et al* 2007; Riccaboni *et al*, 2008).

Dans tous les cas, l'incidence d'anomalies chromosomiques était plus élevée dans le groupe de patients avec azoospermie que dans le groupe OATS, ce qui montre que l'incidence des anomalies chromosomiques augmente quand le nombre de spermatozoïdes diminue (Rosenbusch, 2010).

Dans notre étude, les deux groupes de patients caryotypés ne montrent que des anomalies chromosomiques gonosomiques (47,XXY; 46,XY/47,XXY; 47,XYY; 46,XY/47,XYY et un homme 46,XX) (Tableau 18).

Le syndrome de Klinefelter a été trouvé chez 5 patients (4 patients azoospermiques et un avec une OATS), 3 avec une formule chromosomique homogène et 2 patients avec un caryotype en mosaïque. Le syndrome 47,XYY libre et homogène chez un patient et en mosaïque chez trois patients dont un avec une oligospermie sévère. Le syndrome du mâle 46, XX chez un patient azoospermique.

Alkhalef *et al* (2002) ont rapporté une fréquence d'anomalies chromosomiques de 11% (13/118) dont le syndrome de klinefelter est le plus fréquent. Ce chercheur a décrit une nouvelle mutation chromosomique structurale, 46,XY, del(21) (pter;q11.2).

Addourouj (2010) dans une étude menée sur 85 marocains infertiles rapporte une fréquence de 28,24% de caryotypes anormaux dont 92% sont des anomalies de nombres et 8% des anomalies de structures, une prédominance des anomalies gonosomiques sur les anomalies autosomiques (respectivement 96% et 4%) est observée.

Une nouvelle anomalie de structure de type translocation réciproque entre le bras long (q32) du chromosome 3 et le bras long du 21 (q22) [46, XY t (1; 21) (q32;

q22]) a été décrite (Iravathy *et al*, 2010). Il semble que le chromosome 21 soit fortement impliqué dans les infertilités.

La pertinence des anomalies chromosomiques somatiques chez les patients qui sont par ailleurs phénotypiquement normaux réside dans leurs possibles effets néfastes sur la fécondité et/ou la transmission des aberrations génétiques pour la descendance. Cependant, bien que le caryotype 47,XXY est presque inévitablement associé à une azoospermie, l'existence d'une spermatogenèse testiculaire focale ne peut être exclue avec certitude (Tachdjian *et al*, 2003). Avant l'introduction de l'ICSI, les perspectives de fécondité pour la grande majorité des patients KS était sans espoir. À ce jour, 54 enfants normaux sont nés à partir de 122 hommes atteints de SK par ICSI avec des spermatozoïdes testiculaires (48 enfants, 118 patients) ou éjaculés (6 enfants de 4 patients). Bien que la grande majorité des enfants nés de pères avec KS sont chromosomiquement normaux, le risque de produire une descendance avec aneuploïdies chromosomiques est significatif, en particulier le risque d'engendrer un 47,XXY ou un enfant 47,XXX.

D'autre part, il a été montré que les patients atteints de syndrome de Klinefelter en mosaïque 46,XY/47,XXY sont plus susceptibles de montrer une spermatogenèse résiduelle avec oligozoospermie, mais, le risque génétique chez la progéniture reste encore inconnu (Rosenbusch, 2010).

En revanche, il est bien connu que les hommes porteurs de translocations équilibrées (Robertsoniennes ou réciproques) qui présentent un phénotype normal et sont en bonne santé ont un risque élevé de produire des gamètes déséquilibrés. Dans de tels cas, ces aberrations chromosomiques structurales équilibrées exposent la progéniture à un risque accru de translocation déséquilibrée avec de graves défauts phénotypiques tels que le retard mental et une dysmorphogénèse. Plusieurs études ont rapporté des aneuploïdies chez les bébés conçus par des hommes porteurs d'anomalies chromosomiques structurales. Ces anomalies affectent négativement non seulement la croissance de l'embryon, mais peuvent aussi conduire à des échecs pré ou post-implantatoires et à des pertes fœtales précoces (Dada *et al*, 2007).

L'anomalie des chromosomes sexuels 47,XYY (dont on a trouvé 1 cas avec un caryotype libre et homogène et 3 cas en mosaïque) est la deuxième cause la plus fréquente chez les hommes infertiles présentant un déficit testiculaire d'origine chromosomique (Ferlin *et al*, 2006).

Dans la littérature, il est rapporté que le 47,XYY peut être associé à l'Y dicentrique et que la présence de deux chromosomes Y favorise l'apparition des cellules à 45,XO. Cette même étude a rapporté une incidence de 1,5 pour 1000 nouveaux-nés pour ce syndrome et que le phénotype de ces patients est variable (Aktas *et al*, 2006).

Une autre étude a rapporté que ce syndrome peut être associé au syndrome de Prader Willi (Odent *et al*, 2001).

Si la plupart des hommes double Y sont fertiles, la fréquence de cette anomalie est cependant quatre fois plus élevée chez les sujets infertiles que dans la population générale. La question de savoir pourquoi seuls certains hommes 47,XYY ont des problèmes de fertilité n'est pas encore résolue (Siffroi *et al*, 2003).

La plupart de ces hommes 47,XYY ont une descendance à caryotype normal. Une élévation du taux d'aneuploïdie spermatique touchant les chromosomes sexuels est décrite chez ces sujets. Ces anomalies chromosomiques spermatiques semblent moins fréquentes si le sujet a un caryotype en mosaïque et une spermatogenèse normale. Une relation semble exister entre le degré de mosaïcisme, l'élimination pré méiotique du chromosome Y surnuméraire et les altérations du processus méiotique (Rives *et al*, 2004).

À cause d'une fréquence prétendument plus élevée des super mâles parmi les criminels, les chercheurs ont cru à une époque que les individus 47,XYY souffraient de sévères troubles de la personnalité et qu'ils présentent des risques élevés de violence et de criminalité, des investigations plus poussées ont montré qu'il n'en était pas le cas. La majorité des individus 47,XYY sont phénotypiquement et psychologiquement sains, possèdent des capacités intellectuelles conformes à la moyenne et ne présentent pas de tendance criminelles particulières (Gusbin *et al*, 2006).

Dans notre échantillon, un de nos patients était porteur du syndrome du mâle XX ; L'étude des six marqueurs STS qui étaient absents a confirmé l'absence du chromosome Y chez ce patient; le marqueur STS du gène SRY, utilisé comme contrôle positif dans notre technique, était également négatif.

Ce patient présente des organes génitaux anormaux (ambigus), une gynécomastie bilatérale, des testicules, des ovaires et un utérus. Il s'agit d'un hermaphrodisme vrai. Ce syndrome représente environ 2% des hommes infertiles (Ammar-Keskes, 2007).

Ce trouble de la différenciation sexuelle 46, XX dans lequel le développement des testicules survient en l'absence d'un chromosome Y est rencontré chez des hommes phénotypiquement semblables à des patients atteints du syndrome de Klinefelter.

Berkovitz (1992) et Vilain *et al* (1994) ont montré par PCR le cas de mâle 46,XX, SRY négatif. En outre, Dada (2002), a également rapporté, en utilisant la FISH un patient avec une constitution chromosomique 46,XX et SRY négatif. Pour expliquer le phénotype masculin en absence du chromosome Y et du gène SRY, Mc Elreavey *et al* (1993), ont proposé l'existence d'un gène autosomique, Z, qui régule négativement le développement sexuel masculin et a postulé que le marqueur SRY réprime l'activité du locus Z. Il est possible que dans cette situation le gène dans le locus Z puisse avoir une mutation récessive, de sorte qu'il ne peut pas désactiver les gènes masculins déterminants. Ainsi, jusqu'à présent, plusieurs gènes impliqués dans le déterminisme du sexe ont été publiés (Bashamboo et Mc Elreavey, 2013), une mutation affectant l'un de ces gènes pourrait être responsable du phénotype de notre patient 46,XX et SRY négatif.

Le nombre d'anomalies de structure continue à susciter l'intérêt des chercheurs à travers le monde. Ainsi, récemment, Perrin *et al* (2012) ont trouvé une nouvelle anomalie chromosomique concernant un chromosome marqueur hétérochromatique et dicentrique qui dérive du chromosome 22 chez un patient oligoasthénospermique.

### - **Les microdélétions du chromosome Y**

Les techniques de génétique moléculaire ont dévoilé un certain nombre de facteurs étio-pathogénétiques, y compris les microdélétions du bras long du chromosome Y (Yq) associées à l'infertilité masculine.

La fréquence de ces microdélétions varie de 0 à 60% (Fernanda *et al*, 2011). Les données de la littérature indiquent qu'un taux élevé de ces mutations est constaté chez les hommes azoospermiques par rapport aux hommes oligozoospermiques.

Dans la présente étude, nous rapportons la première analyse de ce type d'anomalie du chromosome Y dans la population algérienne, nous avons trouvé une microdélétion du chromosome Y dans seulement 1,3% (1/80) de tous les hommes infertiles étudiés et elle concerne la région AZFc (Article sous presse). Ce résultat est en conformité à celui des études antérieures de Balkan *et al* (2008).

Des études similaires effectuées par El Awady *et al* (2004) sur 33 patients infertiles Égyptiens, par Rejeb *et al* (2007) sur 146 hommes infertiles tunisiens, par Imken *et al* (2007) sur 127 patients marocains ont trouvé des fréquences de 12% ; 6,85% ; 3,15% respectivement.

Trois études indépendantes effectuées toutes au Brésil ont trouvé des fréquences différentes de microdélétions du chromosome Y. Ces fréquences étaient de 43,48% (Arruda *et al*, 2007) ; 6,7% (SaoPedro *et al*, 2003) ; 4,2% (Fernanda *et al*, 2011).

Il ressort de l'ensemble de ces données que la fréquence des microdélétions chez les patients infertiles est soumise à une grande variabilité. Un certain nombre de facteurs ont été proposés pour expliquer cette variation, y compris l'origine ethnique, *la situation géographique, l'influence de l'environnement et les méthodes de sélection des patients*. De même que les méthodes expérimentales employées en fonction de l'utilisation de l'ADN du sang ou du sperme.

Les délétions dans la région AZFc sont les plus abondantes, la suppression complète de cette région est l'une des causes moléculaires les plus fréquentes de l'infertilité masculine sévère soit 60% des délétions, suivie par les délétions de la région AZFb et les délétions combinées impliquant différentes régions AZF (35%). Les microdélétions AZFa sont extrêmement rares (5%) et des microdélétions isolées ont été signalées dans cette région (Krausz *et al*, 2003; Mirfakhraie *et al*, 2010).

En revanche, Mirfakhraie *et al* (2010) ont rapporté une prévalence élevée (66,67%) de microdélétions AZFb chez les patients iraniens atteints d'azoospermie non obstructive idiopathique.

Les phénotypes associés aux microdélétions des différentes régions AZF sont variables. Les délétions de la région AZFa conduisent généralement au syndrome de de cellules Sertoli seules. La région AZFb est impliquée dans la régulation de la méiose (Ferlin *et al*, 2003). Les délétions AZFc ont été associées à une variété d'altérations spermatiques, allant de l'azoospermie à l'oligozoospermie avec des phénotypes testiculaires différents (Ferlin *et al*, 2006). Bien que la plupart des microdélétions soient associées à une insuffisance spermatogénique sévère, Wang *et al* (2010) ont rapporté qu'il y avait un taux de prévalence légèrement plus élevée de microdélétions AZF chez les patients oligozoospermiques.

Dans cette étude, il est fortement recommandé par l'European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) et l'Académie Européenne d'Andrologie (LEE), l'utilisation de six STS dans l'étude des délétions. Simoni *et al* (1999) ont mis au point un système de détection minimum (sY84 et sY86 pour AZFa, sY127 et sY134 pour AZFb, sY254 et sY255 pour AZFc) qui a été considéré comme une méthode relativement fiable pour identifier 90% des microdélétions AZF et a été largement appliqué par de nombreux laboratoires (Aknin-Seifer et Touraine, 2003).

### - **Polymorphisme de la MTHFR**

Le polymorphisme C677T de la MTHFR est l'un des polymorphismes les plus étudiés chez l'homme, car il est lié à diverses maladies multifactorielles. Cette mutation C677T conduit à la production d'une enzyme thermolabile. La MTHFR, joue un rôle important dans le métabolisme des folates, et les taux d'homocystéine pourraient affecter la synthèse d'ADN et la méthylation. Il y a de nombreuses preuves expérimentales que les enzymes clés du métabolisme des folates sont nécessaires à la spermatogenèse : chez des souris mâles adultes, les sévères carences en MTHFR causent une spermatogenèse anormale et une infertilité (Kelly *et al*, 2005).

Chez l'homme, l'allèle T du SNP C677T peut réduire l'activité de la MTHFR et les sujets porteurs du génotype TT sont associés à un état de méthylation génomique diminué par rapport à ceux avec le génotype CC (Zhou-Cun *et al*, 2007). En outre, les individus qui sont homozygotes pour la mutation MTHFR ont des concentrations élevées d'homocystéine à jeun lorsque la concentration plasmatique en folates est basse (Jacques *et al*, 1996) et un niveau élevé d'homocystéine peut induire l'auto-oxydation qui causerait des dommages à l'ADN, ces dommages peuvent se produire au niveau de la lignée germinale, le stress oxydatif engendré modifierait les membranes cellulaires (Sheweita *et al*, 2005).

Une amélioration de la qualité du sperme (tel que le nombre de spermatozoïdes et la motilité) après un cycle de traitement de spermatogenèse par l'acide folique a été rapportée (Bentivoglio *et al*, 1993). Cet effet a été constaté uniquement chez les hommes porteurs du génotype sauvage 677CC et il n'y avait aucune amélioration significative de la concentration du sperme que ce soit pour l'hétérozygote C/T ou

l'homozygote T/T (Ravel *et al*, 2009). Ces données indiquent que le métabolisme des folates joue un rôle clé dans le maintien de la spermatogenèse.

Récemment, Safarinejad *et al* (2011) ont trouvé une corrélation positive entre les concentrations sériques d'acide folique et la densité des spermatozoïdes ( $r = 0,74$  ;  $p = 0,001$ ), le pourcentage de spermatozoïdes avec mobilité progressive ( $r = 0,68$ ,  $P = 0,001$ ), ainsi que le pourcentage de spermatozoïdes avec une morphologie normale ( $r = 0,72$  ;  $p = 0,001$ ).

Nos résultats ont montré que la MTHFR C677T n'est pas un facteur de risque pour l'infertilité masculine (Chellat *et al*, 2012). Cela peut être expliqué par le fait que les facteurs environnementaux et d'autres gènes contribuent également au bon fonctionnement de la spermatogenèse.

Ebisch *et al* (2003), suggèrent que le polymorphisme C677T n'est pas un facteur de risque pour l'infertilité masculine bien qu'ils indiquent que les folates jouent un rôle important dans la production de sperme. Stuppia *et al* (2003) rapportent qu'il n'y avait pas de différence significative dans la fréquence des hétérozygotes CT et des homozygotes TT et a également suggéré que certains gènes autres que le gène MTHFR dans la voie méthylation de l'ADN pourraient affecter l'infertilité masculine. En outre, deux études françaises ont examiné l'incidence des polymorphismes dans les gènes MTHFR (R68Q, A222V et E429A), la méthionine synthase réductase MTRR; (I22M et S175L) et cystathionine bêta-synthase (CBS; G307S). Ravel *et al* (2009) et Montjean *et al* (2011) ont signalé qu'il n'y avait pas de signification entre la réduction du nombre de spermatozoïdes et les polymorphismes des enzymes impliquées dans le métabolisme des folates dans la population française.

Contrairement à ces résultats, Han-chul *et al* (2006) par l'analyse d'un grand nombre de sujets et une sélection plus spécifique de patients, ont démontré la première preuve génétique que les génotypes C677T MTHFR, A2756G MS et A66G MTRR étaient indépendamment associée à l'infertilité masculine dans la population coréenne.

Plusieurs autres études sont aussi en contradiction et ont démontré que le génotype MTHFR 677TT est un facteur de risque génétique de l'infertilité masculine, en particulier avec l'OAT sévère et l'azoospermie non obstructive (Reyes-Engel *et al*,

2002; Castro *et al*, 2004; Park *et al*, 2005; Zhou-Cun *et al*, 2007; Tetik *et al*, 2008 ; Gava *et al*, 2010).

Ces résultats contradictoires des études menées sur différentes populations suggèrent que le rôle du polymorphisme C677T dans la susceptibilité à l'infertilité masculine peut dépendre de facteurs ethniques ou géographiques (Zhou Cun-*et al*, 2007). En plus les interactions gènes-nutriments et gènes-environnement semblent affecter l'impact de ces variantes génétiques (Toffoli et De Mattia, 2008).

Il a été également rapporté que les études d'association avec un échantillon plus large et donc la puissance de l'étude doivent être effectuées pour identifier un risque relatif associé à ces polymorphismes (Ravel *et al.*, 2009). Dans les analyses de génomes entiers, les calculs de puissance standard indiquent que jusqu'à 1000 participants sont nécessaires pour détecter des effets génétiques importants et au moins 4000 échantillons sont requis pour détecter de petits effets (Wang *et al*, 2005). Cependant, certaines études ont suggéré que les associations fortes peuvent être détectées même dans des échantillons de taille modeste (Purcell *et al*, 2003). Il est rapporté que les études portant sur des cohortes plus importantes sont celles qui déclarent des modestes associations avec les polymorphismes de la MTHFR (Ravel *et al*, 2009).

### - **Mutations du gène NR5A1**

Dans cette première étude effectuée en Algérie, nous rapportons qu'une mutation dans NR5A1 est associée à une insuffisance spermatogénique. Cela élargit la gamme des phénotypes associés à des mutations dans le gène NR5A1, qui à ce jour ont été rapportés uniquement en association avec des formes plus sévères de dysgénésie gonadique ou ayant d'importantes anomalies génitales (Ambigüités sexuelles) telles que l'hypospadias pénoscrotale, anorchidie ou la cryptorchidie.

Le séquençage de toute la région codante de NR5A1 a été réalisé sur un total de 69 hommes infertiles recrutés (Exclusion des patients porteurs d'anomalies chromosomiques et du patient porteur de la microdélétion en AZFc) soit 138 allèles. Nous avons identifié un seul homme infertile (1,47%) porteur d'une mutation hétérozygote dans NR5A1. La mutation est située à l'intérieur de la boîte FTZ-F1- (p.Val83Gly) (Tableau 22 et Figure 26).

N'ayant pas effectué l'analyse d'autres membres de la famille, nous ne pouvons conclure s'il s'agit d'une mutation de novo ou héritée.

Le propositus a des taux élevés de FSH et de LH et un taux bas de testostérone, ainsi qu'une hypotrophie testiculaire bilatérale, suggérant un diagnostic en faveur d'une forme bénigne de dysgénésie gonadique.

La plupart des études publiées sur NR5A1, ont été effectuées sur des cas présentant un désordre de développement sexuel ou une insuffisance ovarienne prématurée (Lin et Achermann, 2008; Lourenço *et al*, 2009; Allali *et al*, 2011). Nous n'avons pas trouvé d'autres études réalisées sur les hommes infertiles.

Bashamboo *et al* (2010), ont testé l'hypothèse que des mutations dans NR5A1 peuvent être responsables des infertilités masculines. Cette équipe de chercheurs de l'institut Pasteur de Paris à laquelle je me suis intégrée pour ce travail a séquencé le gène NR5A1 chez 315 hommes présentant un défaut spermatogénique idiopathique et a identifiée 7 mutations hétérozygotes dans NR5A1. Toutes les mutations ont été trouvées dans une région charnière bien conservée de la protéine. L'étude fonctionnelle réalisée par ces mêmes chercheurs a indiqué que ces mutations altèrent l'activité transcriptionnelle des gènes de la cascade du déterminisme du sexe. Ces mutations n'ont pas été trouvées chez plus de 4000 contrôles testés.

La recherche de l'implication d'autres gènes et polymorphismes avec l'infertilité masculine fait l'objet de nombreux travaux et projets de recherche à travers le monde. Récemment, une méta analyse a été entreprise par Wei *et al* (2012) sur l'implication du polymorphisme G-29A, 919A>G, 2039A>G du récepteur de la FSH. Les chercheurs n'ont pas trouvé d'association significative entre ces polymorphismes et le risque d'une infertilité masculine.

Guixiang *et al* (2011) s'est intéressé à l'implication de certains gènes antioxydants (GPX1 « glutathione peroxidase 1 », CAT « catalase », PON1 « Paraoxonase 1, NQO1 « NAD(P) H dehydrogenase, quinone 1 », SOD2 « superoxide dismutase 2, mitochondrial » et SOD3 « superoxide dismutase 3, extracellular »). Les polymorphismes PON1 Arg192Glu (rs662) et SOD2 Val16Ala (rs4880) sont associés avec un grand risque d'une infertilité masculine.

Miyamoto *et al* (2012) ont découvert par séquençage direct, un nouveau gène candidat pour l'infertilité masculine (HORMAD1 « HORMA domain containing 1 ») qui joue un rôle important dans la formation du complexe synaptonémal au cours du

stade pachytène de la méiose et dont deux polymorphismes (c.163A>G), SNP2 (c.501T>G) représentent un facteur de risque potentiel pour l'infertilité masculine.

Moul *et al* (2012) en séquençant tous les exons du gène HSF2 (Heat Shock transcription Factor 2) ont identifié de nouvelles mutations à effet dominant-négatif associées avec des azoospermies non obstructives idiopathiques. HSF2 régule l'expression de nombreux gènes HSP (Heat Shock Protein) au cours du développement y compris HSPA2, HSPH, HSPB, HSP90, HSP27. HSP en tant que chaperons participent aux mouvements intracellulaires des protéines, préviennent l'agrégation des protéines altérées, éliminent les protéines anormales et contribuent à la conformation correcte des protéines nouvellement synthétisées au cours de la spermatogenèse (Lanneau, 2010).

La production continue de spermatozoïdes est un processus biologique strictement régulé, tant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel. Récemment, les petits ARN non codants ont été identifiés dans la lignée germinale mâle et dans les cellules somatiques testiculaires et se sont avérés essentiels à la fertilité masculine. La présence de petits ARN non codants (miARN, endo-siARN et piARN) ainsi que celle des protéines nécessaires à leur biogenèse ont été décrites dans les différentes sous-populations de cellules germinales, telles que les spermatocytes pachytènes, les spermatides rondes et allongées et les cellules de Sertoli (Romero *et al*, 2012).

Tous ces travaux montrent la complexité du phénomène d'infertilité masculine d'où la difficulté à trouver des solutions de santé publique.

# *Conclusion et perspectives*

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

La génétique de l'infertilité est un nouveau champ de recherche qui prendra sans aucun doute de l'importance dans un proche avenir.

Notre travail de recherche avait pour but d'approfondir l'exploration cytogénétique et moléculaire du génome somatique chez des patients atteints d'un trouble sévère de la spermatogenèse.

Concernant l'exploration hormonale, une différence significative dans les niveaux de FSH et LH entre le groupe d'infertiles avec azoospermie et le groupe oligo-asthéo-tératozoospermique a été observée. Selon ces données, une prospection des taux des hormones est recommandée pour une évaluation du degré de sévérité de l'infertilité chez ce groupe de patients.

Pour l'analyse cytogénétique, les anomalies chromosomiques ont été trouvées avec une fréquence de 12,5% (10/80 patients), plus fréquente dans le groupe azoospermie (10%) (8/80) que dans le groupe OAT (2,5%) (2/80). Comparable à celles décrites dans la littérature. La fréquence élevée des anomalies chromosomiques suggère fortement que le caryotype devrait être une partie obligatoire du dépistage génétique de routine pour les hommes infertiles en Algérie, en particulier avant toute programmation de procréation assistée, ceci peut diminuer les risques d'échec, le cout étant très élevé.

L'exploration moléculaire et en particulier l'analyse des microdélétions du chromosome Y, a démontré que ces anomalies peuvent expliquer certains cas d'infertilité idiopathique. Une fréquence de 1,3% a été observée dans notre population d'étude. La microdélétion a concerné la région AZFc chez un patient azoospermique. Il semble évident que les microdélétions du chromosome Y peuvent inclure une cause génétique de l'infertilité masculine. Toutefois, la fréquence de ces anomalies chez les hommes peut différer d'une population à une autre, selon l'appartenance ethnique et géographique et semble ainsi beaucoup plus faible dans notre pays. Bien que la probabilité de positivité semble faible, un examen génétique moléculaire du chromosome Y doit être offert aux hommes dont la spermatogenèse est sévèrement altérée (azoospermie non obstructive ou une oligozoospermie sévère). Un conseil génétique adéquat doit accompagner ce bilan car les hommes porteurs d'une microdélétion et traités par ICSI doivent savoir qu'ils transmettront cette anomalie à toute leur descendance mâle.

Les résultats que nous avons obtenus dans la prospection du polymorphisme de la MTHFR, ont montré que la mutation C677T n'est pas un facteur de risque pour la fertilité masculine. L'explication de nos données peut résider dans le fait que, dans notre échantillon, d'autres facteurs génétiques et/ou environnementaux seraient impliqués, par exemple d'autres polymorphismes comme la MTHFR A1298C, G1793C, de la méthionine synthase (MS) et de la méthionine synthase réductase (MTRR).

L'analyse du gène SF1 (NR5A1), a révélé une nouvelle mutation hétérozygote dans un site critique de la protéine et qui peut expliquer le phénotype du propositus. En se référant à d'autres études de ce gène, nous pouvons conclure que des mutations au niveau de ce gène peuvent être responsables de certains cas d'infertilité idiopathique, ainsi ce gène pourrait devenir un marqueur de l'infertilité. Son analyse par séquençage est quasi importante et doit être généralisée à tous les patients infertiles.

Jusqu'à présent aucun traitement efficace ou médicament n'a été identifié pour améliorer les paramètres spermatiques. Les antioxydants peuvent être bénéfiques mais cela doit être confirmé dans de grandes études prospectives de rentabilité.

### **En perspectives :**

Nos résultats ouvrent des perspectives intéressantes à travers l'étude cytogénétique et moléculaire tant sur le plan recherche fondamentale pour le déterminisme génétique du sexe et la reproduction qu'en recherche appliquée pour la prise en charge des patients infertiles. Ainsi, nous suggérons qu'une étude approfondie sur un échantillon plus large soit entreprise sur d'autres gènes et polymorphismes parmi lesquels :

- les Polymorphismes des gènes métaboliques et antioxydants (CYP1A1, EPHX1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, GPX1, CAT, PON1, NQO1, SOD2/MnSOD, and SOD3), les gènes de réparation de l'ADN (XRCC1, XPD6, XPD23, hOGG1).
- l'étude de l'expression du gène TDRP1 dont le rôle important dans la spermatogenèse a été démontrée récemment.

- l'étude des variations du génome mitochondrial associées à l'infertilité masculine.
- l'étude de la méiose masculine serait également très informative dans l'exploration des causes de l'infertilité.

L'importance de la découverte d'une cause génétique pour l'aide au diagnostic, le conseil génétique, mais aussi pour un accroissement de nos connaissances fondamentales en biologie de la reproduction reste déterminante.

# *Références bibliographiques*

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Abdel Raheem A, Ralph D, Minhas S.** Male infertility. *Br J Med Surg Urol.* 2012; 5: 254-268.

**Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL.** A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet.* 1999; 22: 125-126.

**Achermann JC, Ozisik G, Ito M, Orun A, Harmanci K, Gurakan B, Jameson L.** Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor- 1, in a dose-dependent manner. *J Clin Endocr Metab.* 2002; 87: 1829-1833.

**Addourouj MI.** Profil cytogénétique de l'infertilité masculine. Thèse en médecine. Maroc : Université Rabat. 2010.

**Agata M.** DNA methylation at imprinted and non-imprinted genes in the sperm of men affected by severe male factor infertility. Thesis in Reproductive and Developmental Sciences. Columbia: The University of British Columbia. 2010; 199 p.

**Ahda Y, Gromoll J, Wunsch A, Asatiani K, Zitzmann M, Nieschlag E, Simoni M.** Follicle-stimulating hormone receptor gene haplotype distribution in normozoospermic and azoospermic men. *J Androl.* 2005; 26:494-499.

**Aknin-Seifer IE and Touraine RL.** A simple low cost and non invasive method for screening Y-chromosome microdeletions in infertile men. *Hum Reprod.* 2003; 18: 257-261.

**Aktas D, Alikasifoglu M, Gonc N, Senocak ME, Tuncbilek E.** IsodicentricY (p11.32) chromosome in an infant with mixed gonadal dysgenesis. *European Journal of Medical Genetics.* 2006; 49: 141–149.

**Alkhalaf M, Verghese L, Muharib N.** A cytogenetic study of Kuwaiti couples with infertility and reproductive disorders: short arm deletion of chromosome 21 is associated with male infertility. *Ann Genet.* 2002; 45:147-149.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Allali S, Muller JB, Brauner R, Lourenço D, Boudjenah R, Karageorgou V, Trivin C, Lottmann H, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fekete C, De Dreuzy O, Mc Elreavey K, Bashamboo A.** Mutation analysis of NR5A1 encoding steroidogenic factor 1 in 77 patients with 46,XY disorders of sex development (DSD) including hypospadias. *PLOS One*. 2011; 6:117.

**Aleisa NAS.** Semen characteristics of fertile and subfertile men in a fertility clinic and correlation with age. *Journal of King Saud University – Science*. 2012.

**Ammar-Keskes L, Chakroun N, Ben Hamida A, Hadj-Kacem L, Bouayed Abdelmoula N, Ayadi H, Nabil Mhiri M, Rebaii T, Bahloul A.** Aspects cliniques et biologiques de l'azoospermie chez l'homme infertile en Tunisie. *Andrologie*. 2007; 17: 71-79.

**Andersson AM, Jørgensen N, Frydelund-Larsen L, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE.** Impaired Leydig Cell Function in Infertile Men: A Study of 357 Idiopathic Infertile Men and 318 Proven Fertile Controls. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004; 89: 3161-3167.

**Arrighi FE and Hsu TC.** Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*. 1971; 10: 81-86.

**Arruda JT, Bordin BM, Santos PR, Mesquita WE, Silva RC, Maia MC, Approbato MS, Florencio RS, Amaral WN, Rocha Filho MA, Moura KK.** Y chromosome microdeletions in Brazilian fertility clinic patients. *Gen Mol Res*. 2007; 6: 461-469.

**Balkan M, Tekes S, Gedik A.** Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with Oligozoospermia and Azoospermia in Southeast Turkey. *J Assist Reprod Genet*. 2008; 25: 559-565.

**Bashamboo A, Ferraz-de-Souza B, Lourenco D, Lin L, Sebire N J, Montjean De, Bignon-Topalovic J, Mandelbaum J, Siffroi J-P, Christin-Maitre S, Radhakrishna U, Rouba H, Ravel C, Seeler J, Achermann J C, Mc Elreavey K.** Human Male Infertility Associated with Mutations in NR5A1 Encoding Steroidogenic Factor 1. *The American Journal of Human Genetics*. 2010; 87: 505-512.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Bashamboo A and Mc Elreavey K.** Gene mutations associated with anomalies of human gonad formation. *Sex Dev.* 2013; 7: 126-46.

**Behlke MA, Bogan JS, Beer-Romero P, Page DC.** Evidence that the SRY protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome. *Genomics.* 1993; 17: 736–739.

**Bentivoglio G, Melica F, Cristoforoni P.** Folinic acid in the treatment of human male infertility. *Fertil Steril.* 1993; 60: 698-701.

**Berger SL.** Histone modifications in transcriptional regulation, *Curr Opin Genet Dev.* 2002; 12: 142-148.

**Berkovitz GD.** Abnormalities of gonad determination and differentiation. *Sem Perinatology.* 1992; 16: 289-298.

**Bezold G, Lange M, Peter RU.** Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1172-1173.

**Biermann K and Steger K.** Epigenetics in male germ cells, *J Androl.* 2007; 28: 466-480.

**Bird A, Tate P, Nan X, Campoy J, Meehan R, Cross S, Tweedie S, Charlton J, Macleod D.** Studies of DNA methylation in animals, *J Cell Sci.* 1995; 19: 37-39.

**Bloom SE and Goodpasture C.** An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum Genet.* 1976; 34: 199-206.

**Butler JM.** Recent developments in Y-short tandem repeat and Y-single nucleotide polymorphism analysis. *Forensic Science Review.* 2003; 15-20.

**Cameron Sprague DC.** Structure and function of the deleted in azoospermia gene. *These medicines.* Texas: Saint Edward's University. 2006; 198 p.

**Caspersson T, Simonsson E, Zech L.** UV-absorption and quinacrine mustard fluorescence patterns for chromosome aberration study in Chinese hamster. *Exp Cell Res.* 1970; 63: 243-244.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Castro R , Rivera I , Ravasco P , Camilo M , Jakobs C , Blom H and de Almeida IT.** 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C/T and 1298A/C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet.* 2004; 41: 454-458.

**Charmot-Bensimon D et Dudley K.** Documents de cours du Master BBSG de l'Université de la Méditerranée Aix-Marseille II. 2005-2006. Disponible sur <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/ky/ky.htm> (consulté le: 25.06.2012).

**Chen J, Giovannucci E, Kelsey K.** A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 1996; 56: 4862-4864.

**Courchesne A.** Comparaison de deux nouvelles méthodes d'évaluation de la fertilité masculine avec le spermogramme chez des patients ayant recours à la fécondation in vitro. Thèse Sciences Biomédicales. Montréal : Université de Montréal, 2009 ; 91 p.

**Czyba J-C et Montella A.** Testicules et épидидymes. Biologie de la reproduction humaine. Sauramps medical. Montpellier. 1993 ; 49-83 p.

**Dada R, Ahmad ME, Talwar R, Kucheria K.** Clinical and genetic study of a XX (SRY negative) Male. *Medicine on line.* 2002.

**Dada R, Kumar R, Shamsi MB, Singh S, Sharma CRK, Varshney A.** Implications of cytogenetic abnormalities and azoospermia factor microdeletions in assisted procreation. *Journal of Reproduction & Contraception.* 2007; 18: 231-235.

**De Braekeleer M, Dao TN.** Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod.* 1991; 6: 245-250.

**De Braekeleer M, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Amice V, Amice J et Morel F.** Chromosomal abnormalities in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. In *Cytogenetics and infertility* (ed. M. De Braekeleer). Transworld Research Network. 2006; 113-129.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**De Kretser DM, Buzzard JJ, Okuma Y, O'Connor AE, Hayashi T, Lin SY, Morrison JR, Loveland KL, Hedger MP.** The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 225: 57-64.

**Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, Perrin J, Martinez D, Sèle B, Jouk PS, Ohlmann T, Rousseaux S, Lunardi J, Ray PF.** Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploidy spermatozoa and causes male infertility. *Nature Genetics.* 2007; 39:661-665.

**Dieterich K, Zouari R, Harbuz R, Vialard F, Martinez D, Bellayou H, Prisant N, Zoghmar A, Guichaoua MR, Koscinski I, Kharouf M, Noruzinia M, Nadifi S, Sefiani A, Lornage J, Zahi M, Viville S, Sèle B, Jouk PS, Jacob MC, Escalier D, Nikas Y, Hennebicq S, Lunardi J, Ray PF.** The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Human Molecular Genetics.* 2009; 18: 1301-1309.

**Ebisch IM, van Heerde WL, Thomas CM, van der Put N, Wong WY, Steegers-Theunissen RP.** C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism interferes with the effects of folic acid and zinc sulfate on sperm concentration. *Fertil Steril.* 2003; 80: 1190-1194.

**Egea G.** Caractérisation de 10 marqueurs chromosomiques Surnuméraires (mcs) : Apport de l'hybridation génomique comparative sur Microreseau (cgh-array). Thèse Pharmacie. Grenoble. Université Joseph Fourier. 2010 ; 125 p.

**El Awady MK, El shatter S F, Ragaa E, Atef KH, Shaheen IM, Megiud Na.** Molecular study on y chromosome microdeletions in Egyptian males with idiopathic infertility. *Asian j Andro.* 2004; 6: 53-57.

**El Inati E, Muller J, Viville S.** Autosomal mutations and human spermatogenic failure. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2012; 1822: 1873-1879.

**El Kerch F, Lamzouri A, Laarabi FZ, Zahi M, Ben Amar B, Sefiani A.** Confirmation of the high prevalence in Morocco of the homozygous mutation c.144delC in the aurora

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

kinase C gene (AURKC) in the teratozoospermia with large-headed spermatozoa. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. 2011; 40: 329-333.

**Faure AK**. Exploration du génome et de l'épigénome dans les troubles sévères de la spermatogenèse chez l'homme. Thèse Biologie. Grenoble : Université Joseph Fourier–Grenoble I. 2007 ; 131 p.

**Ferlin A, Arredi B, Foresta C**. Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol*. 2006; 22: 133-141.

**Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B, Foresta C**. The human Y chromosome's azoospermia factor b [AZFb] region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J Med Genet*. 2003; 40: 18-24.

**Fernanda AM, Denise M Ch, Bianca B, Gava MM, Glina S, Belangero SI, Barbosa CP**. Chromosomal and Molecular Abnormalities in a Group of Brazilian Infertile Men with Severe Oligozoospermia or Non-Obstructive Azoospermia Attending an Infertility Service. *Int Braz J Urol*. 2011; 37: 244-5.

**Ferraz-de-Souza B, Lin L, Achermann JC**. Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011; 336: 198-205.

**Gabriel-Robez O, Delobel B, Croquette MF, Rigot JM, Djelati R, Rumpler Y**. Synaptic behaviour of sex chromosome in two XYY men. *Annales de Génétiques*. 1996; 39:129-132.

**Gam odil MP**. Profil cyto-spermiologique de l'époux dans les couples stériles en milieu négro-africain au Sénégal. Thèse médecine. Sénégal : Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 2002; 68 p.

**Gava MM, de Oliveira, Chagas E, Bianco B, Christofolini DM, Pompeo AC, Glina S, Barbosa CP**. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Are Related to Male Infertility in Brazilian Men. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010; 15: 153-157.

**Geidam AD, Yawe KDT, Adebayo AEA, Idrisa A**. Hormonal profile of men investigated for infertility at the University of Maiduguri in northern Nigeria. *Singapore Med J*. 2008; 49: 538.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Goodfellow PN, Lovell-Badge R.** SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet.* 1993; 27: 71–92.

**Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Rozen R.** Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome.* 1998; 9: 652-666.

**Guillaumot P and Benahmed M.** Prolactin receptors are expressed and hormonally regulated in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1999; 149: 163-8.

**Guixiang J, Aihua G, Yubang W, Cong H, Fan H, Yong Z, Ling S, Xinru W.** Genetic variants in antioxidant genes are associated with sperm DNA damage and risk of male infertility in a Chinese population. *Free Radical Biology & Medicine.* 2012; 52: 775–780.

**Gusbin N, Verloes A, Daly A, Beckers A.** Les grandes tailles : quelques grands syndromes et revue de la littérature. *Rev Med Liege.* 2006; 61: 572-580.

**Gusmao L, Brion M, González-Neira A, Lareu M, Carracedo A.** Y-chromosome specific polymorphisms in forensic analysis. *Legal Medicine.* 1999; 1: 55-60.

**Hagenas L and Ritzén EM.** Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP). *Mol Cell Endocrinol.* 1975; 2: 339-50.

**Han-Chul L, Yu-Mi J, Sook Hwan L, Kwang Yul C, Seung-Hun S, Nam Keun K, Kyo Won L, Suman L.** Association study of four polymorphisms in three folate-related enzyme genes with non-obstructive male infertility. *Human Reproduction.* 2006; 21: 3162-3170.

**Hess RA and Renato de Franca L.** Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.* 2008; 1-15.

**Hugon-Rodin J.** Analyse de 9 patientes avec une insuffisance ovarienne précoce et une translocation x-autosome par puces à ADN pangénomiques de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Thèse Gynécologie Médicale. Paris : Université Paris Descartes (Paris 5). 2010 ; 92 p.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Hsu CC, Kuo PH, Lee IW, Su MT, Tseng JT, Kuo PL.** Quantitative trait analysis suggests human DAZL may be involved in regulating sperm counts and motility. *Reproductive BioMedicine Online*. 2010; 21: 77-78.

**Imken L, El Houate B, Chafik A, Nahili H, Boulouiz R, Abidi O, Chadli E, Louanjli N, Elfath A, Hassar M, Mc Elreavey K, Barakat A, Rouba H.** AZF microdeletions and partial deletions of AZFc region on the Y chromosome in Moroccan men. *Asian J Androl*. 2007; 9: 674–678.

**Iravathy Goud K, Dayakar S, Babu SJ, Vijaya Lakshmi K.** Chromosomal abnormalities in a male partner who was a candidate for assisted reproductive techniques. *Apollo Medicine*. 2010; 7: 211-213.

**Iwamoto T, Nozawa S, Yoshiike M, Hoshino T, Baba K, Matsushita T, Tanaka SN, Naka M, Skakkebaek NE, Jørgensen N.** Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Hum. Reprod*. 2006; 2: 760-765.

**Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R.** Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*. 1996; 93: 7-9.

**Jaenisch R and Bird A.** Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003; 33: 245-254.

**Johnson MH and Everitt BJ.** *Reproduction*. De boeck University. Paris, Bruxelles. 2002; 299 p.

**Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine D, Suominen JSS, Petersen JH, Andersen AN, Auger J, Cawood E, Horte A, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Vierula M, Toppari J, Skakkebaek NE.** Regional differences in semen quality in Europe. *Hum. Reprod*. 2001; 16: 1012–1019.

**Kayed H F, Mansour RT, Aboulghar M A, Serour GI, Amer AE, Abdrazik A.**

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Screening for chromosomal abnormalities in 2650 infertile couples undergoing ICSI. *Reprod. Biomed. Online.* 2006; 12: 359-370.

**Kelly TL, Neaga OR, Schwahn BC, Rozen R, Trasler JM.** Infertility in 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR)-Deficient Male. Mice Is Partially Alleviated by Lifetime Dietary Betaine Supplementation. *Biology of Reproduction.* 2005; 72: 667-677.

**Köhler B, Lin L, Mazen I, Cetindag C, Biebermann H, Akkurt I, Rossi R, Hiort O, Grüters A, Achermann JC.** The spectrum of phenotypes associated with mutations in steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1, Ad4BP) includes severe penoscrotal hypospadias in 46, XY males without adrenal insufficiency. *Eur. J. Endocrinol.* 2009; 161: 237-242.

**Koşar PA, Özçelik N, Koşar A.** Cytogenetic abnormalities detected in patients with non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet.* 2010; 27: 17-21.

**Krause W.** Prolactin level in the serum of patients with disorders of spermatogenesis. *Hautarzt.* 1978; 29: 77-81.

**Krausz C, Forti G, Mc Elreavey K.** The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl.* 2003; 26: 70-75.

**Krausz C, Rajpert-De Meyts E, Frydelund-Larsen L, Quintana-Murci L, Mc Elreavey K, Skakkebaek NE.** Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 2638-2642.

**Köhler B, Lin L, Mazen I, Cetindag C, Biebermann H, Akkurt I, Rossi R, Hiort O, Grüters A, Achermann JC.** The spectrum of phenotypes associated with mutations in steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1, Ad4BP) includes severe penoscrotal hypospadias in

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

46,XY males without adrenal insufficiency. *European Journal of Endocrinology*. 2009; 161: 237–242.

**Kremp L.** Puériculture et pédiatrie. Wolters kluwer. France, 2007 ; 1535 p.

**Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Kusz-Zamelczyk K, Ginter-Matuszewska B, Sajek M, Jaruzelska J.** Gene Mutations Associated with Male Infertility, *Male Infertility*, Dr. Anu Bashamboo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0562-6, InTech. 2012 ; Available from: <http://www.intechopen.com/books/male-infertility/gene-mutations-associated-with-male-infertility>.

**Lammarrone E, Balet R, Lower AM, Gillott C, Grudzinskas JG.** Male infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003; 17: 211-229.

**Lanneau D.** Rôle des Protéines de Choc Thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique. Thèse Biochimie Cellulaire et Moléculaire. Bourgogne : Université de Bourgogne 2010 ; 187 p.

**Laron Z, Dickerman Z, Zamir R, Galatzer A.** Paternity in Klinefelter's syndrome: a case report. *Arch Androl*. 1982; 8:149–151.

**Lin L and Achermann JC.** Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev* 2008; 2:200-209.

**Liu PY and Handelsman DJ.** The present and future state of hormonal treatment for male infertility. *Human Reproduction Update*. 2003; 9: 9-23.

**Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC, Mc Elreavey K, Bashamboo A.** Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med*. 2009; 360: 1200-1210.

**Marchina E, Imperadori L, Speziani M, Omodei U, Tombesi S, Barlati S.** Chromosome abnormalities and Yq microdeletions in infertile Italian couples referred for assisted reproductive technique. *Sex. Dev.* 2007; 1: 347-352.

**Martinerie L, Bouvattier C, Lombes M.** SF-1, un acteur majeur de la différenciation

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

surrénalienne et sexuelle : implications dans les dysgénésies gonadiques et l'insuffisance ovarienne prématurée. *Annales d'Endocrinologie*. 2009; 70: 26-32.

**Mau-Holzmann UA**. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res*. 2005; 111: 317-336.

**Mc Elreavey K, Chantot-Bastarud S, Ravel C, Mandelbaum J, Siffroi J-P**. Chromosome Y et infertilité masculine : qu'est-ce qu'un chromosome Y normal ? *Journal de la Société de Biologie*. 2008; 202: 135-141.

**Mc Elreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M**. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 3368-3372.

**Micic S, Micic M, Ilic V, Genbacev O**. Hyperprolactinemia: histological and meiotic analyses in azoospermic men. *Arch Androl*. 1982; 8: 217-220.

**Mirfakhraie R, Mirzajani F, Kalantar M S, Montazeri M, Salsabili N, Pourmand GR, Houshmand M**. High prevalence of AZFb microdeletion in Iranian patients with idiopathic non-obstructive azoospermia. *Indian J Med Res*. 2010; 132: 265-270.

**Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Mikio N, Horikawa M, Saijo YA, Sengoku K**. Single-nucleotide polymorphisms in *HORMAD1* may be a risk factor for azoospermia caused by meiotic arrest in Japanese patients. *Asian Journal of Andrology*. 2012 ; 14: 580-583.

**Montjean D, Benkhalifa M, Dessolle L, Cohen-Bacrie P, Belloc S, Siffroi JP, Ravel C, Bashambo A, Mc Elreavey K**. Polymorphisms in *MTHFR* and *MTRR* genes associated with blood plasma homocysteine concentration and sperm counts. *Fertility and Sterility*. 2011; 95: 635-40.

**Mou L, Wang Y, Li H, Huang Y, Jiang T, Huang W, Li Z, Chen J, Xie J, Liu Y, Jiang Z, Li X, Ye J, Cai Z, Gui Y**. A dominant-negative mutation of *HSF2* associated with idiopathic azoospermia. *Hum Genet*. 2012.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE.** Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*. 2002; 108: 475-487.

**Noma K C, Allis D, Grewal SI.** Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* 293. 2001; 1150-1155.

**Oates RD, Silber Sh, Brown LG, Page DC.** Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI Human Reproduction. 2002; 11: 2813–2824.

**Odent S, Taque S, Lucas J, Le Mee F, Le Marec B.** Prader–Willi syndrome and polygonosomal abnormalities in males: about a Prader–Willi/47, XYY patient. *Annales de Génétique*. 2001; 44: 1-3.

**Park JH, Lee HC, Jeong YM, Chung TG, Kim HJ, Kim NK, Lee SH, Lee S.** MTHFR C677T polymorphism associates with unexplained infertile male factors. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2005; 22: 361-368.

**Perrin A, Nguyen M H, Delobel B, Gueganic N, Basinko A, Le Bris M-J, Douet-Guilbert N, De Braekeleer M, Morel F.** Characterization and meiotic segregation of a supernumerary marker chromosome in sperm of infertile males: Case report and literature review. *European Journal of Medical Genetics*. 2012; 55: 743-746.

**Philibert P, Zenaty D, Lin L, Soskin S, Audran F, Léger J, Achermann JC, Sultan C.** Mutational analysis of steroidogenic factor 1 (NR5a1) in 24 boys with bilateral anorchia: a French collaborative study. *Hum Reprod*. 2007; 22: 3255-3261.

**Pina-Neto JM, Carrara RCV, Bisinella R, Mazzucatto LF, Martins MD, Sartoratto E, Yamasaki R.** Somatic cytogenetic and azoospermia factor gene microdeletion studies in infertile men. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006; 39: 555-561.

**Poncelet C et Sifer Ch.** *Physiologie, Pathologie et Thérapie de la reproduction chez l'humain*. Paris. Springer Verlag France. 2011; 691 p.

**Purcell S, Cherny SS, Sham PC.** Genetic power calculator: design of linkage and

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics*. 2003; 19: 149-150.

**Quintana-Murci L, Krausz C, Mc Elreavey K.** The human Y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic Science International*. 2001; 118: 169–181

**Rajender S, Avery K, Agarwal A.** Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutat Res*. 2011; 727: 62-71.

**Ravel C et Siffroi J-P.** Anomalies de structure du chromosome Y et syndrome de Turner. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 2009; 37: 511-518.

**Ravel C, Chantot-Bastarud S, Chalmey C, Barreiro L, Akinin-Seifer I, Pfeffer J, BerthauIsabelle, Mathieu E, Mandelbaum J, Siffroi J-P, Mc Elreavey K, Bashamboo A.** Lack of Association between Genetic Polymorphisms in Enzymes Associated with Folate Metabolism and Unexplained Reduced Sperm Counts. *PLOS ONE*. 2009; 4: 6540.

**Ravel C, Mc Elreavey K, Mandelbaum J, Siffroi J-P.** Polymorphismes génétiques et infertilité masculine. *mt médecine de la reproduction*. 2007; 9: 219.

**Ravel C et Siffroi JP.** Chromosome Y et spermatogénèse. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 2009; 37: 901-907.

**Ravel C.** L'infertilité masculine: génétique et épigénétique. Thèse Médecine. Paris. Université Pierre et Marie Curie Paris-6. 2007.

**Raven P, Johnson G, Losos J, Singer S.** *Biologie*. De Boeck Université. Bruxelles. 2007; 1256 p.

**Rejeb I, M'rad R, Maazoul F, Trabelsi M, Ben Jemaa L, Chaabouni M, Zhioua F, Chaabouni H.** Y chromosome microdeletions in Tunisian infertile males. *Pathologie Biologie*. 2008; 56: 111-115.

**Hess RA and de Franca LR.** Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, edited by C. Yan Cheng. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. 2008.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Reyes-Engel A, Muñoz E, Gaitan MJ, Fabre E, Gallo M, Dieguez JL, Ruiz M, Morell M.** Implications on human fertility of the 677C→T and 1298A→C polymorphisms of the MTHFR gene: consequences of a possible genetic selection. *Molecular Human Reproduction*. 2002; 8: 952–957.

**Riccaboni A, Lalatta F, Caliarì I, Bonetti S, Somigliana E, Ragni G.** Genetic screening in 2,710 infertile candidate couples for assisted reproductive techniques: results of application of Italian guidelines for the appropriate use of genetic tests. *Fertil. Steril.* 2008; 89: 800–808.

**Rives N, Mousset-Siméon N, Sibert L, Duchesne V, Macé L, Milazzo J-P, Mazurier S, Macé B.** Anomalies chromosomiques du spermatozoïde. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 2004; 32: 771–778.

**Romero Y, Calvel P, Nef S.** Petits ARN non codants et spermatogenèse = Non-coding small RNAs and spermatogenesis. *MS. Médecine sciences*. 2012 ; 28: 490-496.

**Rosenbusch B.** Somatic chromosomal abnormalities in couples undergoing infertility treatment by intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Genetics*. 2010; 89: 105-108.

**Rouiller-Fabre V, Lambrot R, Muczynski V, Coffigny H, L'écureuil C, Pairault C, Bakalska M, Courtot A-M, Frydman R, Habert R.** Ontogenèse et régulations des fonctions testiculaires chez le fœtus humain. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 2008; 36: 898-907.

**Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S.** Relationship between Genetic Polymorphisms of Methylenetetra hydrofolate Reductase (C677T, A1298C, and G1793A) as Risk Factors for Idiopathic Male Infertility. *Reproductive Sciences*. 2011; 18: 304-315.

**SaoPedro SL, Fraietta R, Spaine D, Porto CS, Srougi M, Cedenho AP, Avellar MC.** Prevalence of Y chromosome deletions in a Brazilian population of non-obstructive

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- azoospermic and severely oligozoospermic men. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 787-793.
- Scarabelli L, Caviglia D, Bottazzi C, Palmero S.** Prolactin effect on pre-pubertal Sertoli cell proliferation and metabolism. *J Endocrinol Invest.* 2003; 26: 718-22.
- Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H.** Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab.* 2005; 6: 495-501.
- Siffroi J-P, Chantot-Bastaraud S, Ravel C.** Origines géniques et chromosomiques des anomalies de la spermatogenèse : aspects cliniques et rapports avec les modèles animaux. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité.* 2003; 31: 504–515.
- Simoni M, Bakker E, Eurlings MC, Matthijs G, Moro E, Müller CR, Vogt PH.** Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions. *Int J Androl.* 1999; 22: 292-299.
- Simoni M, Gromoll J, Höppner W, Kamischke A, Krafft T, Stähle D, Nieschlag E.** Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone [FSH] receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 751-755.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlfsing T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S, Page DC.** The male specific region of the Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 2003; 423: 825-837.
- Solari AJ.** Synaptonemal complex analysis in human male infertility. *Eur J Histochem.* 1999; 43: 265–276.
- Stuppia L, Gatta V, Scarciolla O, Colosimo A, Guanciali-Franchi P, Calabrese G, Palka G.** The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and male infertility in Italy. *Endocrinol Invest.* 2003; 26: 620-622.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Tachdjian G, Frydman N, Morichon-Delvallez N, Dû AL, Fanchin R, Vekemans M, Frydman R.** Reproductive genetic counselling in non-mosaic 47,XXY patients: implications for preimplantation or prenatal diagnosis: Case report and review. *Hum Reprod.* 2003;18: 271-275.

**Kelly TLJ, Neaga OR, Schwahn BC, Rozen R, Trasler Jacquetta M.** Infertility in 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-deficient Male. Mice is partially alleviated by lifetime dietary betaine supplementation. *Biology of Reproduction.* 2005; 72: 667–677.

**Tetik A, aliyeva U, Cetintas VB.** Influence of Methylenetetrahydrofolate reductase (mthfr) C677T and A1298C gene polymorphisms on male infertility in Turkish infertile men with azoospermia and oligozoospermia. *Eur Urol Suppl.* 2008; 7: 92

**Therman E and Susman M.** Human chromosome: structure, behaviour and effects. New York: Springer-Verlag. 1993; 273-287.

**Toffoli G and De Mattia E.** Pharmacogenetic relevance of MTHFR polymorphisms. *Pharmacogenomics.* 2008; 9: 1195–206.

**Torniero C, Dalla-Bernardina B, Fontana E, Darra F, Danesino C, Elia M.** Electroclinical findings in four patients with karyotype 47,XXY. *Brain and Development.* 2011; 33: 384-389.

**Vialard F, Mandon-Pépin B, Pellestor F, Ziyat A , Albert M, Molina-Gomes D, Selva J, Fellous M.** Anomalies génétiques et infertilité masculine. *Androl.* 2009; 19: 2-16.

**Vilain E, le Fiblec B, Morichon-Delvallez N, Brauner R, Dommergues M, Dumez Y, Jaubet F, Boucekkine C, Mc Elreavey K, Vekemans M, Fellous M.** SRY-negative XX foetus with complete male phenotype. *Lancet.* 1994; 343: 240-241.

**Vogt PH, Falcao CL, Hanstein R, Zimmer J.** The AZF proteins. *Int J Androl.* 2008; 31: 383-394.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Walker WH, Daniel PB, Habener JF.** Inducible cAMP early repressor ICER down-regulation of CREB gene expression in Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1998; 143: 167-178.

**Walker WH.** Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010; 365: 1557-1569.

**Wang RX, Fu C, Yang YP, Han RR, Dong Y, Dai RL, Liu RZ.** Male infertility in China: laboratory finding for AZF microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile men from Northeastern China. *J Assist Reprod Genet.* 2010; 27: 391-396.

**Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA.** Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet.* 2005; 6: 109-118.

**Wang XQ, Zhang HY, Qi QW, Zhao J, Xu L.** Relationship between follicle stimulating hormone and AZF microdeletion on Y chromosome in patients with azoospermia or severe oligozoospermia. *Chinese journal of medical genetics.* 2011; 559-561.

**Wei Wu, Hongquan Cai, Hong Sun, Jing Lu, Dan Z, Yufeng Q, Xiumei Han, Xiaobing N, Chuncheng L, Yankai X, Shoulin W, Bart De M, Kathleen M, Xinru W.** Follicle stimulating hormone receptor G-29A, 919A>G, 2039A>G polymorphism and the risk of male infertility: A meta-analysis. *Gene.* 2012; 505: 388-392

**Wing-Yee L and Yan Cheng C.** Transcription regulation in spermatogenesis. Series: Special Books. 2008.

**World Health Organization WHO.** Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed, Cambridge University Press, Cambridge.1999.

**Zhang Y, Zhong L, Xu B, Yang Y, Ban R, Zhu J, Cooke HJ, Hao Q, Shi Q.** SpermatogenesisOnline 1.0: a resource for spermatogenesis based on manual literature curation and genome-wide data mining. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (Database issue).

**Zhang ZB, Jiang YT, Yun X, Yang X, Wang RX, Dai RL, Liu RZ.** Male infertility in Northeast China: a cytogenetic study of 135 patients with non-obstructive azoospermia

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

and severe oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29: 83-87.

**Zhou-Cun A, Yuan Y, Si-Zhong Z, Na L, Wei Z.** Single nucleotide polymorphism C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene might be a genetic risk factor for infertility for Chinese men with azoospermia or severe oligozoospermia. *Asian J Androl.* 2007; 9: 57-62.

**Zhu B, Zheng Y, Pham AD, Mandal SH. Erdjument-Bromage, Tempst P, Reinberg D.** Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol. Cell.* 2005; 20: 601-611.

### Sites Web:

- <http://www.ncbi.nlm.gov/genomeguide/>
- [http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch07/Y\\_chromosome.html](http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch07/Y_chromosome.html)

# *Annexes*

## ANNEXES

### ANNEXE I : Paramètres du spermogramme. Normes de l'OMS: (1999 puis mai 2010) (Aly Abbara, 2010)

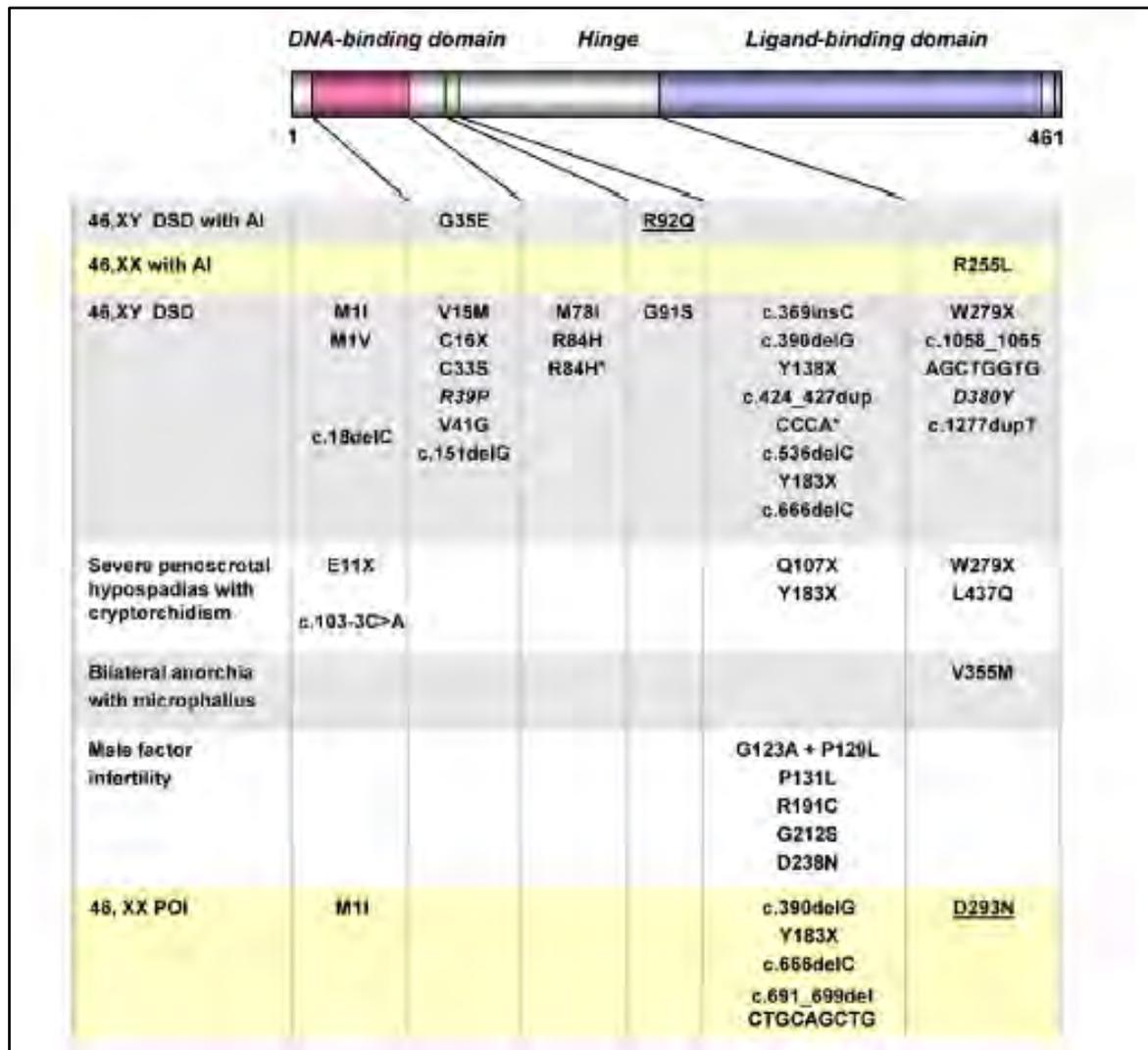
Normes OMS		Définitions de l'anomalie		Seuil correspondant à une baisse de fécondité
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Volume du sperme :               <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ OMS-1999 : <math>\geq 2</math> ml</li> <li>◦ OMS-2010 : <math>\geq 1,5</math> ml (1,4 - 1,7)                   <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ L'abstinence entre 2 et 8 jours.</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• OMS-1999 : <math>&lt; 2</math> ml = <u>hypospermie</u></li> <li>• OMS-2010 : <math>&lt; 1,5</math> ml = <u>hypospermie</u></li> <li>• <math>&gt; 6</math> ml : <u>hyperspermie</u></li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Numération des spermatozoïdes (par ml):               <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ OMS-1999 : <math>&gt; 20</math> millions/ml</li> <li>◦ OMS-2010 : <math>\geq 15</math> millions/ml (12 - 16)</li> </ul> </li> <li>• Numération des spermatozoïdes (par éjaculat):               <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ OMS-1999 : <math>&gt; 40</math> millions</li> <li>◦ OMS-2010 : <math>&gt; 39</math> millions (33 - 46)</li> </ul> </li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 : <u>azoospermie</u></li> <li>• OMS-1999 :               <ul style="list-style-type: none"> <li><math>\leq 20</math> millions/ml = <u>oligospermie</u></li> </ul> </li> <li>• OMS-2010 :               <ul style="list-style-type: none"> <li><math>\leq 15</math> millions/ml = <u>oligospermie</u></li> </ul> </li> <li>• <math>&gt; 200</math> millions/ml : <u>polyspermie</u></li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>&lt; 5</math> millions/ml</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mobilité des spermatozoïdes à la première heure après l'éjaculation.</li> <li>• classement :               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Grade (a) : mobilité en trajet fléchissant rapide (<math>&gt;25</math> <math>\mu</math>m/s)</li> <li>- Grade (b) : mobilité lente et progressive (5-25 <math>\mu</math>m/s).</li> <li>- Grade (c) : mobilité sur place.</li> <li>- Grade (d) = immobilisé</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• OMS-1999 :               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mobilité progressive (de type a+b) des spermatozoïdes : <math>\geq 50</math> %</li> </ul> </li> <li>• OMS-2010               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mobilité progressive de type a+b) des spermatozoïdes : <math>\geq 32</math> % (31 à 34) (ou <math>\geq 30</math> %)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• OMS-1999 : <math>&lt; 50</math> %</li> <li>• OMS-2010 : <math>&lt; 32</math> % (ou <math>&lt; 30</math> %)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>asthénospermie</u></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 à 30 %</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• OMS-1999 :               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mobilité type (a) des spermatozoïdes : <math>\geq 25</math> %</li> </ul> </li> <li>• OMS-2010               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mobilité de type (a) des spermatozoïdes : non précisé</li> <li>- Mobilité de type (a+b+c) des spermatozoïdes : <math>\geq 40</math> % (38 - 42)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• OMS-1999 : type (a) : <math>&lt; 25</math> %</li> <li>• OMS-2010 : type (a+b+c) <math>&lt; 40</math> %</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mobilité à la quatrième heure après l'éjaculation.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chute de mobilité inférieure à 50 % comparativement aux chiffres de la première heure</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chute de mobilité supérieure à 50 %</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Morphologie normale des spermatozoïdes :               <ul style="list-style-type: none"> <li>OMS-1999 : <math>\geq 30</math> % (selon la classification David)</li> <li>OMS-2010 : <math>\geq 4</math> % (3,0 - 4,0) (se rapproche de la classification Kruger)</li> <li>Ou : <math>\geq 15</math> % (selon la classification de David modifiée par Auger et Eustache).</li> </ul> </li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• OMS-1999 (classification David) : <math>&lt; 30</math> % = <u>tératospermie</u></li> <li>• OMS-2010 : <math>&lt; 4</math> % = <u>tératospermie</u> (se rapproche de la classification Kruger)</li> <li>Ou : <math>&lt; 15</math> % (selon la classification de David modifiée par Auger et Eustache).</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>&lt; 4</math> %</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucocytes <math>&lt; 1</math> million/ml</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>&gt; 1</math> million/ml : <u>leucospermie</u></li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH :               <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ OMS-1991 : entre 7,2 et 8</li> <li>◦ OMS-2010 : <u>non précisé</u></li> </ul> </li> </ul>				
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vitalité des spermatozoïdes :               <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ OMS-1999 : <math>\geq 60</math> %.</li> <li>◦ OMS-2010 : <math>\geq 58</math> % (55 - 63)</li> </ul> </li> </ul>				
<ul style="list-style-type: none"> <li>• D'autres valeurs normales (consensus) :               <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ pH : <math>\geq 7,2</math></li> <li>◦ MAR test (anticorps anti spermatozoïdes de type IgA, IgG, IgM fixés sur les spermatozoïdes) : <math>&lt; 50</math> %.</li> <li>◦ Immunobead test (motile spermatozoa with bound particules) (ou spermatozoïde mobile avec anticorps antispermatozoïde) : <math>&lt; 50</math> %</li> <li>◦ Peroxidase-positive leukocytes :</li> </ul> </li> </ul>				
<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Fructose séminale : <math>\geq (13)</math> <math>\mu</math>mol/éjaculat</li> <li>◦ Phosphatase acide séminale : <math>\geq 200</math> U/éjaculat.</li> <li>◦ Acide citrique séminale : <math>\geq 52</math> <math>\mu</math>mol/éjaculat.</li> <li>◦ Zinc séminale : <math>\geq (2,4)</math> <math>\mu</math>mol/éjaculat</li> <li>◦ Seminal neutral glucosidase : <math>\geq (20)</math> mU/éjaculat</li> <li>◦ L-carnitine séminale : 0.8-2.9 <math>\mu</math>mol/éjaculat</li> </ul>				

## Annexe II : Gènes du chromosome Y des régions PAR1, NRY et PAR 2 (Quintana-Murci et al, 2001).

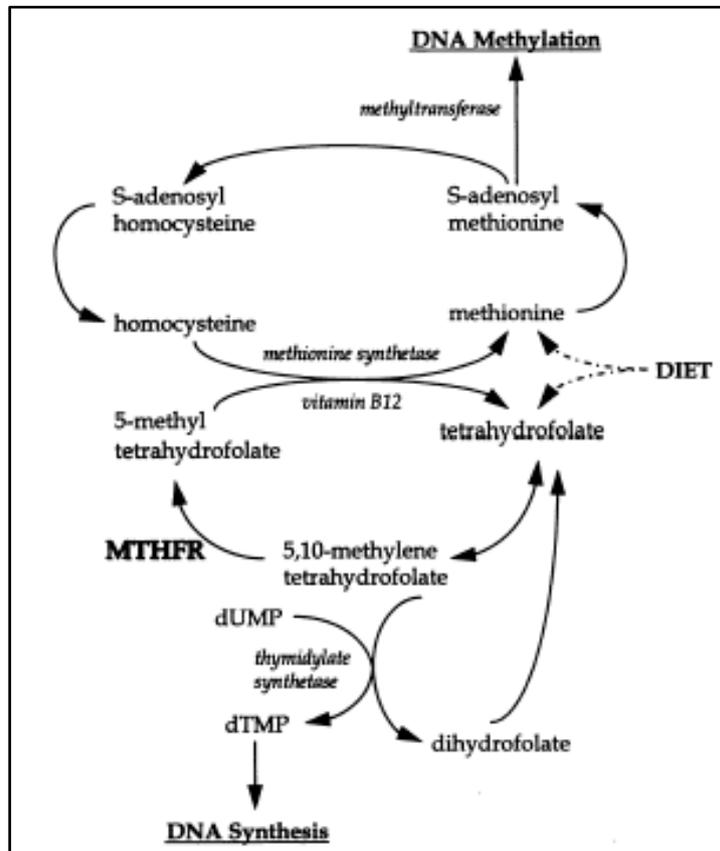
Gene symbol	Gene name	Location	Comments	Associated pathology	X-homologue
<i>PGPL</i>	Pseudoautosomal GTP-binding protein-like	PAR1	Putative GTP-binding protein	Unknown	+
<i>SHOX</i>	Short stature homebox-containing	PAR1	Homeodomain transcription factor	Short stature, Leri-Weill syndrome	+
<i>CSFR2<math>\alpha</math></i>	GM-CSF receptor $\alpha$ -subunit	PAR1	Cytokine receptor	Unknown	+
<i>IL3RA</i>	Interleukin-3 receptor $\alpha$ -subunit	PAR1	Interleukin 3 receptor	Unknown	+
<i>ANT3</i>	Adenine nucleotide translocase	PAR1	Cellular energy metabolism	Unknown	+
<i>ASMTL</i>	Acetylserotonin methyltransferase-like	PAR1	Putative methyltransferase	Unknown	+
<i>ASMT</i>	Acetylserotonin methyltransferase	PAR1	Catalyst for melatonin synthesis	Unknown	+
<i>XE7</i>	X-escape inactivation 7	PAR1	Encodes two hydrophilic proteins of unknown function	Unknown	+
<i>TRAMP</i>	TRAMP	PAR1	Sequence homology with transposases, maybe involved in transposition	Unknown	+
<i>MIC2</i>	MIC2	PAR1	Encodes 12E7 antigen	Unknown	+
<i>SRY</i>	Sex reversal Y	Yp: 1A1A	Testis determining transcription factor	Y + XX male, 46, XY gonadal dysgenesis	-
<i>RP54Y</i>	Ribosomal protein S4, Y	Yp: 1A1B	Component of the ribosome	Turner syndrome?	+
<i>ZFY</i>	Zinc-finger Y	Yp: 1A2	Transcription factor of unknown function	Turner syndrome?	+
<i>PRKY</i>	Protein kinase, Y	Yp: 3C - 4A	Kinase, unknown function	Unknown	+
<i>TSPY<sup>a</sup></i>	Testis-specific protein, Y-encoded	Yp: 3C + 5	Related to SET oncogene, function unknown but may interact with cyclin B	Gonadoblastoma?	-
<i>AMELY</i>	Amelogenin, Y	Yp: 4A	Encodes a tooth enamel protein	Unknown	+
<i>PRY</i>	Putative tyrosine phosphatase protein-related Y	Y: 4A, 6E	Putative membrane transport protein	Infertility?	-
<i>USP9Y</i> (or <i>DDFRY</i> )	Ubiquitin-specific protease, Y (or <i>Drosophila</i> face facets related Y)	Yq: 5C	Putative deubiquitinating enzyme, encodes an H-Y antigen epitope	Azoospermia	+
<i>DBY</i>	DEAD box, Y	Yq: 5C	Putative RNA helicase	Infertility?	+
<i>UTY</i>	Ubiquitous tetratricopeptide repeat motif, Y	Yq: 5C	Function unknown, encodes an H-Y antigen epitope	Infertility?	+
<i>TBAY</i>	Thymosin $\beta$ 4, Y isoform	Yq: 5D	May sequester actin	Infertility?	+
<i>VCY1<sup>a</sup></i>	Variably charged protein, Y1	Yq: 5G	Unknown function	-	+
<i>CDY<sup>a</sup></i>	Chromodomain, Y	Yq: 5L, 6F	Chromodomain protein that may be involved in chromatin modification	Infertility?	-
<i>XKRY<sup>a</sup></i>	XK-related, Y	Yq: 5L	Putative membrane transport protein	Infertility?	-
<i>RBM<sup>a</sup></i>	RNA-binding motif, Y	Yp + q	RNA-binding protein	Infertility?	-
<i>SMCY</i>	Selected mouse cDNA, Y	Yq: 5P	Function unknown, encodes two H-Y antigen epitopes	Unknown	-
<i>EIF1AY</i>	Translation initiation factor 1A, Y	Yq: 5Q	Initiation of translation	Infertility?	+
<i>DAZ<sup>a</sup></i>	Deleted in azoospermia	Yq: 6F	RNA-binding protein	Infertility?	-
<i>VCY2<sup>a</sup></i>	Variably charged protein, Y2	Yq: 6A	Unknown function	Infertility?	-
<i>HSPRY3</i>	Human sprouty3	PAR2	Putative intracellular modulator of FGF and EGF receptor tyrosine kinase activity which antagonises ras/MAP kinase signalling	Unknown	+
<i>SYBL1</i>	Synaptobrevin-like 1	PAR2	Putative membrane protein, may be involved in synaptic signalling	Unknown	+
<i>IL9R</i>	Interleukin 9 receptor	PAR2	Cytokine receptor	Unknown	+
<i>CXYorf1</i>	CXYorf1	PAR2	Unknown function	Unknown	+

<sup>a</sup> Present on the Y chromosome as a multicopy gene family.

**Annexe III : Les différentes mutations de SF-1 identifiées chez l'homme (Ferraz-de-Souza et al, 2011).**



**Annexe IV : Le rôle métabolique de la MTHFR dans le métabolisme des folates impliquant la méthylation et la synthèse de l'ADN (Chen et al, 1996).**



## Annexe V : Fiche de renseignements sur les infertilités masculines.

### I. État civil du patient

Nom et prénom :	Adresse/Tel :
Profession :	Age :

### II. Renseignements cliniques

.....

.....

.....

### III. Biologie

#### 1- Les hormones

FSH = \_\_\_\_\_ , LH = \_\_\_\_\_ , Testostérone = \_\_\_\_\_

#### 2- Spermogramme

	Volume (ml)	NB de SPZ (millions/ml)	Vitalité (%)	Mobilité (%)	Morphologie (%)	Classification
1° Spermogramme						
2° SPG						

#### 3. Carvotype

- Anomalie numérique :
- Anomalie structurale :

#### 4. Étude moléculaire

#### Consentement du Patient

- Je déclare avoir été informé(e), oralement et par écrit, des objectifs et du déroulement de l'étude sur les infertilités masculines.

Lieu, date	Signature du patient
------------	----------------------

**Annexe VI : Valeurs de références des taux d'hormones gonadotropes chez l'homme. (Laboratoire IBN SINA et Clinique IBN ROCHD)**

<b>Paramètres</b>	<b>IBN SINA</b>	<b>IBN ROCHD</b>
<b>FSH</b>	[1,50-12,40]	[1,7-12]
<b>LH</b>	[1,70-8,60]	[1,1-7]
<b>Testostérone</b>	[2,80-11,50]	[3-10,6]

**Annexe VII : Préparation du milieu de EARLE**

- NaCl 6800 mg/l
- Kcl 400 mg/l
- NaH<sub>2</sub> P<sub>0</sub><sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 140 mg/l
- Mg SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 200 mg/l
- Glucose 1000 mg/l
- CaCl<sub>2</sub> 200 mg/l.

**Annexe VIII : Technique d'extraction d'ADN**

**1. Préparation des leucocytes :**

- Dans un tube Falcon de 50 ml, mettre le sang et compléter à 50 ml avec du TE 20:5, laisser 10 mn dans la glace
- Centrifuger 10 mn à 3900 tpm
- Jeter le surnageant
- Ajouter quelques ml de TE 20:5 au culot et le remettre en suspension
- Compléter à 25 ml avec du TE 20:5 et laisser 10 mn dans la glace
- Centrifuger dans les mêmes conditions
- Jeter le surnageant : obtention d'un culot leucocytaire

**2. Extraction de l'ADN :**

- Transvaser le culot des leucocytes dans un tube falcon de 15 ml
- Ajouter 3 ml de tampon de lyse en dilacérant le culot
- Ajouter 200 µl de SDS à 10%
- Ajouter 100 µl de protéinase K à 10 mg/ml
- Agiter le tube sur une roue à 27 °C une nuit
- Le lendemain, refroidir dans la glace
- Ajouter 1 ml de NaCl 4 M et agiter vigoureusement à la main

- remettre 5 mn dans la glace (précipitation des protéines)
- Centrifuger 15 mn à 2500 rpm
- Transvaser le surnageant dans un tube falcon de 50ml, ajouter deux fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi (environ 8 ml) et agiter en retournant le tube plusieurs fois : la pelote d'ADN se forme
- Récupérer la pelote d'ADN avec une pipette pasteur et la rincer deux fois dans l'éthanol à 70 %
- Mettre la pelote dans un tube nunc de 1,5ml

### **3. Solubilisation :**

- Ajouter entre 300 et 1000 µl d'eau bi distillée stérile selon la grosseur de la pelote.
- Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jour).

## **Annexe IX : Préparation des solutions utilisées pour l'extraction d'ADN**

### **1. TE 20 :5 : (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5) auto clavé**

- Tris : 2,422 g/l
- EDTA : 1,86 g/l
- Ajuster le pH avec HCL 1 N

### **2. Tampon de lyse :**

- NaCl 400 mM
- EDTA 2 mM
- Tris 10 mM
- pH 8,2

## **Annexe X : Préparation du TBE 10X et 1X**

### **1. TBE 10X**

- Tris 108 g
- Acide borique 55 g
- Ajuster le PH à 8,3 avec l'acide acétique glacial
- EDTA 9.3 g
- QSP H<sub>2</sub>O pour 1L

### **2. TBE 1X**

- 100 ml de TBE 10X
- 900 ml H<sub>2</sub>O

## RÉSUMÉ

L'infertilité, définie comme l'incapacité de concevoir après 1 an de rapports sexuels réguliers et non protégés, est un problème de santé qui a un impact dans le monde entier. Jusqu'à 50% des cas d'infertilité ont une origine masculine. En dépit de 35 ans de pratique de procréation assistée, un nombre considérable de cas (25-30%) restent idiopathiques. Certains cas d'infertilité pourraient s'expliquer par des causes génétiques. Nous présentons dans cette thèse les informations exigées pour effectuer des études génétiques dans le domaine de l'infertilité, les techniques utilisées et les résultats obtenus jusqu'à présent.

**L'objectif** de l'étude était d'examiner d'éventuelles associations entre les anomalies chromosomiques de nombre ou de structure, les mutations cryptiques, en particulier les microdélétions du chromosome Y, le polymorphisme C677T de la MTHFR et les mutations du gène NR5A1 et l'infertilité masculine.

**Méthodes :** Quarante-neuf hommes atteints d'azoospermie non obstructive et trente et un hommes atteints d'Oligo-astheno-tératozoospermie ont été recrutés dans cette étude. Le caryotypage de lymphocytes sanguins périphériques a été réalisé pour l'ensemble de nos patients en utilisant le R et le G-banding. Six couples d'amorces (STS) ont été utilisés pour détecter les microdélétions AZF par PCR. Le génotypage de la MTHFR a été déterminé en utilisant la PCR-RFLP. L'analyse mutationnelle de SF1 (NR5A1) a été réalisée par séquençage direct.

**Résultats :** Sur les 80 hommes infertiles étudiés, 10 (12,5%) présentaient des anomalies chromosomiques et 1 (1,3%) avait une microdélétion au niveau d'AZFc. Nous n'avons trouvé aucune preuve d'une association entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et la réduction du nombre de spermatozoïdes. Nous avons identifié une nouvelle mutation hétérozygote NR5A1 chez un patient présentant une insuffisance spermatogénique sévère.

**Conclusion :** La présence d'anomalies chromosomiques, des microdélétions du chromosome Y et des mutations dans NR5A1 chez les hommes infertiles suggèrent fortement la généralisation des tests génétiques et cytogénétiques afin de rendre plus efficiente leur prise en charge.

## ملخص

العقم، الذي يعرف بقلبه عدم القدرة على الحمل بعد 1 سنة من لاجتماع المتكاثرين دون موانع، يعيب ويشكل صعيقة هائلة في حياة الزوجين. يتشاكل عوامل الكورون في ما يقرب من نصف هذه الحالات من العقم. في الرغم من 35 عام من الأثمة المساعدة في الإنجاب، عدل في من لالات (52-33%) لاتزال مجهولة السبب. فيمكن في ربع حالات العقم لأبواب وراثية. رقد في هذا البحث متطلبات لأداء دربلات في الوراثة في مجال العقم، ولتقويات الخدمات ولتتطلبها في طلب حصول عليها في الأن.

**الهدف** من هذه الدرلة هو التقييم في الكفاءة وجود القويين في ذوالصبي في اتفق في طفلة AZF للصبي في Y, الكعد الأليليل في MTHFR والطفرة التي فيمكن أن تصيب في NR5A1 وتمت في تسعة وأربع رجال مصاب بولع عدم اللجولات اللفية في غير الأسداد و واحد والثين رجال مصاب ب -Asthen-Oligo-Tératozoospermie

**لطرق** : أجريت للجيل في النمطان ووي للخليل في الدم في طبي استعمال عيار للناطقات R أو G استعمال ستة ملقح محددة (STS) لكشف عن AZF microdélétions باستخدام تقنية PCR. يتم تحدي الأمل للجيل في MTHFR باستخدام تقنية (PCR-RFLP). وتم البحث عن طفرات NR5A1 (SF1) في خلايا اللسل للباشرة.

**للنتائج**: كان من بين 03 جالي علون من العقم، 10 (12,5%) (لهمش ذوق في للصبيات و 1) 1,3% (لبيها AZF microdélétion في AZFc. لم يشر في أي دليل في وجود القويين في عدد الأشكال C677T ل MTHFR ولتفاض عدد اللجولات اللفية كما أن أوجدنا طفرة وراثية في NR5A1 لدا مريض واحد فقط.

**الاستنتاجات**: وقوع كلش وهات للصبي في microdélétions في الصبي في Y وطفرات NR5A1 للكور ال صليين بالعمق في رقة على لاجة إلى الاختبارات للجيلية.

## **ABSTRACT**

Infertility, defined as the inability to conceive after 1 year of regular and unprotected intercourse, is a healthcare problem that has a worldwide impact. Male factors are involved in at least half of these cases of infertility. Despite 35 years of assisted reproductive activities, a considerable number of cases (25–30%) remain idiopathic. Some infertility cases can be explained by genetic causes. We present the requirements for performing informative genetics studies in the field of infertility, the techniques used and the results obtained so far.

**The aim** of the study was to investigate the associations between numerical or structural chromosomal abnormalities, cryptic mutations, particularly Y chromosome microdeletions, MTHFR C677T polymorphism and NR5A1 mutations and male infertility.

**Methods:** Forty-nine men with non-obstructive azoospermia and thirty-one men with OligoAsthenoteratozoospermia were recruited. Karyotype analyses were performed on peripheral blood lymphocytes using standard R or G-banding. Six specific sequence tagged sites (STS) were used to detect AZF microdeletions by PCR. *MTHFR* genotypes were determined using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RLFP) technique. Mutational analysis of SF1 (*NR5A1*) was done by direct sequencing.

**Results:** Of the 80 infertile men, 10 (12.5%) had chromosomal abnormalities and 1 (1.3%) have AZF microdeletion in AZFc. We found no evidence of an association between the polymorphism C677T of the MTHFR and reduced sperm counts and we identified a novel heterozygous NR5A1 mutation only in one patient with severe spermatogenic failure.

**Conclusions:** The occurrence of chromosomal anomalies, Y chromosome microdeletions and NR5A1 mutations among infertile males strongly suggest widespread cytogenetic and genetic testing to make them more efficient care.

<b>Année Universitaire : 2012-2013</b>	<b>Présentée par : REZGOUNE- CHELLAT DJALILA</b>												
<b>Étude cytogénétique et moléculaire des infertilités masculines</b>													
<b>Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur en sciences en génétique des pathologies humaines</b>													
<p>L'infertilité, définie comme l'incapacité de concevoir après 1 an de rapports sexuels réguliers et non protégés, est un problème de santé qui a un impact dans le monde entier. Jusqu'à 50% des cas d'infertilité ont une origine masculine. En dépit de 35 ans de pratique de procréation assistée, un nombre considérable de cas (25-30%) restent idiopathiques. Certains cas d'infertilité pourraient s'expliquer par des causes génétiques. Nous présentons dans cette thèse les informations exigées pour effectuer des études génétiques dans le domaine de l'infertilité, les techniques utilisées et les résultats obtenus jusqu'à présent.</p> <p><b>L'objectif</b> de l'étude était d'examiner d'éventuelles associations entre les anomalies chromosomiques de nombre ou de structure, les mutations cryptiques, en particulier les microdélétions du chromosome Y, le polymorphisme C677T de la MTHFR et les mutations du gène NR5A1 et l'infertilité masculine.</p> <p><b>Méthodes :</b> Quarante-neuf hommes atteints d'azoospermie non obstructive et trente et un hommes atteints d'Oligo-astheno-tératozoospermie ont été recrutés dans cette étude. Le caryotypage de lymphocytes sanguins périphériques a été réalisé pour l'ensemble de nos patients en utilisant le R et le G-banding. Six couples d'amorces (STS) ont été utilisés pour détecter les microdélétions AZF par PCR. Le génotypage de la MTHFR a été déterminé en utilisant la PCR-RFLP. L'analyse mutationnelle de SF1 (NR5A1) a été réalisée par séquençage direct.</p> <p><b>Résultats :</b> Sur les 80 hommes infertiles étudiés, 10 (12,5%) présentaient des anomalies chromosomiques et 1 (1,3%) avait une microdélétion au niveau d'AZFc. Nous n'avons trouvé aucune preuve d'une association entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et la réduction du nombre de spermatozoïdes. Nous avons identifié une nouvelle mutation hétérozygote NR5A1 chez un patient présentant une insuffisance spermatogénique sévère.</p> <p><b>Conclusion :</b> La présence d'anomalies chromosomiques, des microdélétions du chromosome Y et des mutations dans NR5A1 chez les hommes infertiles suggèrent fortement la généralisation des tests génétiques et cytogénétiques afin de rendre plus efficiente leur prise en charge.</p>													
<b>Mots clés :</b> Infertilité masculine, Anomalies chromosomiques, Microdélétion AZF, MTHFR, NR5A1													
<b>Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie et génétique moléculaire</b>													
<p><b>Membres du Jury :</b></p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%;"><b>Président du Jury</b></td> <td><i>Pr Benlatreche C</i></td> </tr> <tr> <td><b>Directrice de thèse</b></td> <td><i>Pr Satta D</i></td> </tr> <tr> <td><b>Examineurs</b></td> <td><i>Pr Mc Elreavey K</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>Pr Abadi N</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>Pr Bouras M</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>Pr Touabti S</i></td> </tr> </table>		<b>Président du Jury</b>	<i>Pr Benlatreche C</i>	<b>Directrice de thèse</b>	<i>Pr Satta D</i>	<b>Examineurs</b>	<i>Pr Mc Elreavey K</i>		<i>Pr Abadi N</i>		<i>Pr Bouras M</i>		<i>Pr Touabti S</i>
<b>Président du Jury</b>	<i>Pr Benlatreche C</i>												
<b>Directrice de thèse</b>	<i>Pr Satta D</i>												
<b>Examineurs</b>	<i>Pr Mc Elreavey K</i>												
	<i>Pr Abadi N</i>												
	<i>Pr Bouras M</i>												
	<i>Pr Touabti S</i>												