



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Science

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

N° d'ordre : 133 / DS / 2016

N° de série : 08 / BioA / 216

Intitulé :

Génétique mitochondriale des infertilités masculines

Présentée et soutenue par : REZGOUNE Mohamed Larbi

Le 13/12/2016

Jury d'évaluation :

Président : ROUABAH Abdelkader (Professeur - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Directrice : SATTA Dalila (Professeur - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Co-directeur : SLAMA Abdelhamid (Professeur - APH Paris, France).

Examineurs : ABADI Nouredine (Professeur - Université Constantine 3),

BELAALOUI Ghania (Maître de conférences A - Université El Hadj Lakhdar, Batna),

BENDJEDDOU Dalila (Professeur - Université 8 Mai 1945, Guelma),

BOUDA Abdennacer (Maître de conférences A - Université Constantine 3).

Année universitaire
2015 – 2016



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Science

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

N° d'ordre : 133 / DS / 2016
N° de série : 08 / BioA / 216

Intitulé :

Génétique mitochondriale des infertilités masculines

Présentée et soutenue par : REZGOUNE Mohamed Larbi

Le 13/12/2016

Jury d'évaluation :

Président : ROUABAH Abdelkader (Professeur - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Directrice : SATTA Dalila (Professeur - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Co-directeur : SLAMA Abdelhamid (Professeur - APH Paris, France).

Examineurs : ABADI Nouredine (Professeur - Université Constantine 3),

BELAALOUI Ghania (Maître de conférences A - Université El Hadj Lakhdar, Batna),

BENDJEDDOU Dalila (Professeur - Université 8 Mai 1945, Guelma),

BOUDA Abdennacer (Maître de conférences A - Université Constantine 3).

Année universitaire
2015 - 2016

***Au Nom de Dieu, le Tout Miséricordieux,
le Très Miséricordieux***

Merci dieu tout puissant, qui m'a honoré d'être parmi ceux qui savent lire et écrire, et qui a guidé mes pas sur le chemin de la science.

Je l'implore de m'éclairer et de me guider sur le droit chemin ...

Remerciements

Ces remerciements sont l'occasion d'exprimer ma gratitude aux personnes qui ont composé mon environnement professionnel durant ces dernières années. Si ces mots semblent bien futiles, ils ont néanmoins le mérite d'être symboliques, de sortir droit du cœur et de montrer qu'il n'est possible d'accomplir un travail de thèse, comme il n'est possible de vivre, qu'en équipe. J'espère qu'ils montrent que, bien plus qu'un appui scientifico-technique, les personnes communément appelées « collègues » ou « chefs », ont contribué à ma vie intérieure. S'il est vrai qu'on met du temps à devenir qui l'on est, soyez assurés que durant ces années vous m'avez tous permis de me rapprocher de qui je suis.

J'espère que le futur me donnera l'occasion de vous témoigner à tous ma gratitude autrement que par ces quelques mots...

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de thèse, **Professeur SATTA Dalila**, qui bien avant de tenir ce rôle, a été mon professeur durant 6 ans et m'a dirigé dans la réalisation de mon mémoire de Magistère, ce qui a, sans conteste, été le point de départ de toute la démarche qui a suivie. Je la remercie de m'avoir aiguillée lors de mes réflexions sur mon projet professionnel et d'avoir, durant ces années d'études, toujours gardé un œil sur moi. Je la remercie d'avoir cru en moi et d'avoir investi autant de temps... le résultat valait le coup même si j'ai mis longtemps à y croire. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant de diriger mes travaux. Je vous remercie d'avoir mis à ma disposition toute la richesse de votre savoir et de votre expérience.

Je vous remercie de vous ériger en modèle : vous montrez en effet chaque jour ce que c'est que d'être passionné et dévoué à son travail. Soyez assurée que je garderai toujours cette image en mémoire et qu'elle me sera souvent utile. Merci d'avoir toujours fait preuve d'une généreuse intransigeance à mon égard. Merci également pour votre humanité quand j'en ai eu besoin plus que jamais.

J'ai énormément appris avec vous tout au long de ces années. Je le dois à vous, au sujet que vous m'avez proposé mais aussi à la liberté que vous m'avez laissée quant à la manière de l'aborder. Votre enthousiasme toujours renouvelé m'a permis de rester positif malgré mes nombreux doutes, particulièrement importants en fin de parcours.

Professeur SLAMA Abdelhamid, je vous remercie d'avoir consacré autant de votre énergie à réussir une codirection de thèse à distance ce qui était loin d'être gagnée d'avance mais nous y sommes parvenues. Merci pour votre méticulosité, votre pédagogie et aussi pour toute la force que vous m'avez insufflée. Autant de compétence alliée à autant de modestie sont difficiles à croire et pourtant bien réelles et tellement précieuses. C'est cette délicate alliance qui m'a donné le courage d'aller au bout. Vous m'avez redonné confiance en moi, au moment où je n'en avais plus du tout. Merci d'avoir respecté mes choix et de m'avoir soutenue pour terminer selon le calendrier que je souhaitais. Merci pour toutes les démarches que vous avez entrepris et qui m'ont immensément facilité l'existence. Merci d'avoir tout fait dans mon intérêt personnel et professionnel. Chacune de nos discussions et entrevues a été une bouffée d'oxygène. Merci pour la décontraction des déjeuners partagés et pour le respect que vous m'avez toujours témoigné. Merci pour votre patience et votre attention, que ce soit pour ce rapport de thèse ou pour les articles. Les discussions dans votre bureau restent parmi les meilleurs moments que j'ai vécus au cours de cette thèse. Je vous suis particulièrement reconnaissant pour m'avoir consacré des mois de votre vie professionnelle.

Lors de la composition de mon jury de thèse, mes choix se sont tournés vers les personnes que je souhaitai voir juger mon travail. Au final, tous « mes vœux » ont été respectés et pour cela je remercie sincèrement les professeurs : **ROUABAH Abdelkader**, **ABADI Nouredine**, **BELAALOUI Ghania**, **BENDJEDDOU Dalila** et le docteur **BOUDA Abdennacer**. C'est pour moi un grand honneur de les compter parmi les membres de mon jury. Je tiens à vous remercier chaleureusement d'avoir accepté de juger mes travaux et d'avoir dégagé du temps pour vous y consacrer. J'ai été touché que vous ayez répondu si rapidement, et avec enthousiasme, à ma demande.

Merci au **Professeur ROUABAH Abdelkader** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je vous suis gré d'avoir accueilli ma demande avec bienveillance. J'espère que vous avez trouvé de l'intérêt à évaluer ma thèse. J'ai eu la chance de vous côtoyer au cours de ma carrière d'étudiant, d'enseignants et d'administrateur, et vous m'avez toujours reçu avec patience et gentillesse. Ça a été pour moi un vrai privilège d'interagir avec vous et je garderai un excellent souvenir de nos collaborations.

Merci au **Professeur ABADI Nouredine** ; je vous suis vraiment gré pour votre investissement dans l'évaluation de mon travail et pour votre implication très positive. Vous êtes à l'origine de nombreux travaux de recherche de notre équipe de génétique et votre engagement sans faille à nous soutenir a toujours susciter mon admiration. Nous vous somme « je parle à mon nom et celui des générations de doctorants en Génétique » redevable. Sans votre contribution rien n'aurait été possible.

Merci au **Professeur BELAALOUI Ghania**; pour qui j'ai le plus grand respect et que je suis ces publications et travaux avec un très vif intérêt. Merci de me donner le privilège de présenter mon travail devant vous.

Merci au **Professeur BENDJEDDOU Dalila** ; qui m'a fait l'honneur, il y'a plusieurs années de cela, d'évaluer mon mémoire de magistère. J'ai gardé de vous un excellent souvenir et je souhaite réitérer l'expérience et me présenter devant vous pour juger mon travail de doctorat avec autant de rigueur et méticulosité.

Merci au **docteur BOUDA Abdennacer**; pour qui j'ai une grande admiration et qui, je suis sûr, apportera un regard nouveau sur mon travail de recherche.

Je voudrais aussi remercier **CORREIA Isabelle** pour m'avoir aidé dans mes premiers moments à la paillasse. Une personne qui donne sans rien attendre en retour. La « technicienne type » en biologie moléculaire ; connaissances exhaustives, rigueur et efficacité auquel s'ajoute un sens de pédagogie et du relationnel hors du commun. Vous êtes un atout précieux et une « référence » dans votre fonction ... Vous m'avez été d'une aide précieuse ... Je garderai de vous un excellent souvenir.

Merci à **VARADA Céline** pour son humour et son amitié particulièrement réconfortante dans les moments difficiles, pour la bonne humeur qu'elle transmet si facilement, pour son rire et pour sa douce gentillesse.

Merci aussi à **OLIVEIRA Christophe** pour son efficacité et sa serviabilité, pour son amitié et son calme impeccable.

Merci à **Yannick** et **Françoise** avec qui j'ai fait mon initiation aux techniques d'enzymologie tissulaire et d'exploration de la chaîne respiratoire mitochondriale. Merci pour l'intérêt que vous m'avez porté, la patience que vous avez montré et la rigueur que vous m'avez appris. Vous aurez pour cela mon éternelle reconnaissance et gratitude.

Merci à **Zaina** et **Alain**, qui, sans vraiment me connaître, m'ont offert, juste parce que j'étais là, parce que je partageais leur espace de travail, quelques mots, quelques avis, quelques sourires qui m'ont été précieux, m'ont donné le bonheur d'être là et la force de continuer... même si ce que vous avez fait vous semble anodin et « normal » vous m'avez permis de me sentir moins « étranger »... je ne vous oublierai jamais.

De peur de ne pas faire de liste exhaustive, j'adresse un grand merci collégial à tous les membres actuels et à ceux qui ont fait partie des laboratoires d'enzymologie tissulaire et de biologie moléculaire de l'APHP Kremlin-Bicêtre, pour tous les services rendus, les conseils et apprentissages de manip, et pour toutes les interactions, scientifiques et autres, que nous avons pu avoir ensemble. Grâce à vous tous cette aventure a été riche et m'a beaucoup apporté.

Merci également à tous mes collègues doctorants devenus des amis, qui ont partagé chaque jour les joies et les déceptions inhérentes au travail de recherche.

Tous les vifs remerciements à tous mes enseignants et aujourd'hui collègues de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des frères Mentouri Constantine 1 qui ont pleinement assuré notre formation durant nos années d'études.

Un spécial remerciement aux responsables administratives de la faculté qui donnent chaque jour de leurs temps et « santé » au service de l'université sans contrepartie. Dévoué à un travail difficile et ingrat, il porte à eux seul sur le dos la réussite de cette faculté à commencer par Monsieur le Doyen **DEHIMAT Laid**, les vices doyens **ROUABAH Abdelkader** et **MERAIHIA Djamel** et les chefs de départements à commencer par **MADACI Brahim**, **BAKA Mbarek**, **NOUADRI Taher**, **NECIB Youcef** et **FERHATI Laid**. Merci pour tous ce que vous faite ...

Un remerciement particulier au Pr **BERERHI El Hacene** directeur de l'institut des sciences vétérinaires qui s'est érigé en modèle pour moi. Avec vous j'ai beaucoup appris ... ce que je suis aujourd'hui je vous le doit en grande partie.

Je tiens à remercier les personnes qui me sont inconnues et qui pourtant, en tant que responsables d'organismes, ont rendu ces travaux de thèses possibles par le soutien financier qu'ils ont pris la responsabilité d'accorder. Sans ce soutien financier, sous forme de stages de formation à l'étranger ou financement des laboratoires de recherche, rien n'aurait été possible.

Je ne saurai exprimer ma gratitude et ma fierté à mon pays qui m'a tant donné, qui m'a permis de devenir ce qui je suis aujourd'hui et auquel je souhaite passer ma vie à le servir.

Un dernier merci, et non pas des moindres à *REZGOUNE-CHELLAT Djalila*, ma femme, ma moitié, pour ces qualités scientifiques qui m'ont été précieuses lors de la rédaction de ce document, qui a toujours été présente, notamment dans les moments difficiles. Elle a su faire passer mes intérêts avant sa famille, son travail, et ses amis pour me suivre dans cette aventure. Merci d'avoir toujours été à mon écoute, de m'avoir continuellement encouragé et supporté, même lorsque mon travail affectait mon humeur, particulièrement ces derniers temps. Merci pour ta patience. Merci infiniment pour cet amour sans conditions.

Merci ! À tous ceux et celles qui m'ont soutenu, assisté, conseillé, secouru (et j'en passe) dans mon cheminement... Que dieu vous garde.

Encore merci à vous, qui avez toujours été là...

Dédicaces

J'ai eu du plaisir à commencer cette thèse, j'ai eu du plaisir à la terminer. Mais, chaque jour qui passe sans que je n'abandonne était un défi de relevé qui appelle un autre. Seule, je n'y serais jamais arrivé. Ce document qui est l'aboutissement de longues années de durs labeurs est le fruit de nombreuses contributions, mais aussi d'un grand soutien moral de tous mes proches. Parce que la Science n'est pas tout et que sans eux je ne serais rien, je ne remercierai jamais assez ma famille et mes amis. À ceux qui me sont les plus chers ... À ceux qui ont toujours crus en moi ... À ceux qui m'ont toujours encouragé :

Djalila ; mon épouse, prunelle de mes yeux, ma tendre et douce moitié, vous êtes la dernière que je remercie et la première à qui je dédie ce travail. Merci pour ta patience qui m'a permis d'avancer le plus sereinement possible. Tu m'apportes chaque jour plus de bonheur, et ces dix ans passées à tes côtés sont, sans aucun doute, les plus belles de ma vie. Être avec toi, c'est une force qui me permet d'envisager des projets que jamais je n'aurais osé imaginer avant. À nos amours et à nos rêves...

À mes très chers parents ; j'ai grandi avec la grandeur de votre âme, cœur et esprit ; j'ai marché avec la droiture et la dignité de votre marche ; j'ai trouvé refuge dans votre amour, votre sacrifice et votre dévouement ; j'ai puisé dans votre foi, patience et persévérance et j'ai trouvé ma lumière et mon chemin dans votre regard pétillant et profond. Mon espérance est la vôtre. Ma réussite est la vôtre. Ma fierté est la vôtre. On reconnaît l'arbre à ses fruits ... acceptez moi comme le fruit de votre labeur et de votre abnégation.

Fatima ; ma mère, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation. Puisse le grand puissant te donner bonne santé et longue vie...

À la mémoire de mon défunt père BOUJEMAA ; vous m'avez appris à cultiver le courage et à toujours relever le défi. J'espère que ce travail sera à la hauteur de vos attentes ! Pour votre amour... Pour tous vos sacrifices et soutien pour parfaire ma formation... Pour tous l'éducation et l'enseignement que vous m'avez transmis... Que ce modeste travail soit pour vous un témoignage de ma profonde affection de mon profond respect et de mon éternelle reconnaissance. Bien qu'aucune dédicace ne saura exprimer ma considération, ma reconnaissance et mon grand amour pour vous.

À la mémoire de mes défunts grands parents SMAINE et AICHA ; merci pour votre soutien et vos prières ! Aucun mot n'exprime l'amour et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Puisse Dieu le tout puissant vous avoir en sa sainte Miséricorde.

À mes tantes HALIMA et FATIMA ZOHRA ainsi que sa fille et cousine KHADIDJA ; je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

À ma belle-famille ; vous m'avez accueilli à bras ouverts dans votre famille. En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. Ce travail est le fruit de votre soutien permanent qui m'a été un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle.

Un profond respect et un remerciement particulier et sincère à **YOUCEF** et **ZAKARIA**, père et frère de substitution, pour tous vos efforts fournis. Vous avez toujours été présents à mes côtés. Que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect.

Je dédie ce travail également à ma belle-mère **FATIHA**, à mon beau-frère **ABDELKADER**, sa femme et leur fils **WASSIM**, à **ZOULEIKHA**, son mari et leurs enfants (**GAMRA** et **AADEN**) et spéciale dédicace à la petite **ASMA**.

À mes amis et collègues de l'université; REDOUANE, MAHMOUD, RAMZY et SAMY.

À mes amis ; AMIR, OUALID, HOUSSINE, BRAHIM, DJABER, DJALOUL, NAIME et FATEH.

À tous ceux et celles qui me donnent des raisons d'être ce que je suis...

Abréviations

ABCD : Agénésie Bilatérale des Canaux Déférents
ADNmt : ADN mitochondrial
AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor
ANT : Adenine Nucleotide Translocator
APE : Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease
APHP : Assistance Publique des Hôpitaux de Paris
AST : ASThénozoospermie
ATCC : American Type Culture Collection
AURKC : AURora Kinase C
AZF : AZoospermia Factor
AZOs : AZOospermie
BBP : Bleu de Bromo-Phénol
BET : Bromure d'Éthidium
BPDE : Benzo(a)Pyrène Diol Époxyde
CDY : Chromo-Domain Protein Y
CFTR : Cystic Fibrosis Trans-membrane conductance Regulator
COX : Cytochrome OXydase
CRM : Chaîne Respiratoire Mitochondriale
CRS : Cambridge Reference Sequence
CSB : Conserved Sequence Box
CYP1A1 : CYtochrome P450 1A1
DAZ : Deleted in AZoospermia
DBY : Dead Box Y
DDE : Dichloro-Diphényl-dichloro-Éthylène
ddNTP : di-désoxyribo- Nucléotide Tri-Phosphates
DDT : Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane
DDX3Y : Dead-box protein 3 Y chromosomal
DFFRY : Drosophila Fat-Facets Related Y
DHT : Di-Hydro-Testostérone
DMSO : Di-Méthyl-Sulf-Oxyde
dNTP : désoxyribo-Nucléotides Tri-Phosphates
dRP : désoxyRibose Phosphate
EDTA : Ethylene Diamino Tetracetic Acid
eIF1AY : eukaryotic translation-Initiation Factor 1A Y isoform
EROs : Espèces Réactives de l'Oxygène
ETAS : Extended Termination Associated Sequences
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide
FEN-1 : Flap ENdonuclease
FIV : Fécondation *In Vitro*
FMN : Flavine Mono-Nucléotide
FSH : Follicle Stimulating Hormone
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HpaII : *Haemophilus parainfluenzae* II
HSP : Heavy Strand Promoter
HWE : Hardy-Weinberg Equilibrium
ICSI : Intra-Cytoplasmic Sperm Injection
KSS : Kearns-Sayre Syndrome
LH : Luteinizing Hormone

LP-BER : Long-Patch-Base Excision Repair
LS : Leigh Syndrome
LSP : Light Stand Promoter
MboII : *Moraxella bovis* II
MELAS : Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke
MERRF : Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers
MET : Microscopie Électronique à Transmission
MMR : Mis-Match Repair
MRP : Mitochondrial RNA Processing
MSY : Male Specific Y chromosome
MTHF : Méthylène Tétra-Hydro-Folate
MTHFR : Méthylène Tétra-Hydro-Folate Réductase
mtSSB : mitochondrial Single Strand Binding protein
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NARP : Neuropathie, Ataxie, Rétinite Pigmentaire
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NER : Nucleotide Excision Repair
NIH : National Institute of environmental Health
NR5A1 : Nuclear Receptor subfamily 5, group A, member 1
NRF-1 : Nuclear Respiratory Factor 1
OAT : Oligo-Asthéno-Tératozoospermie
OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man
OR : Odds Ratio
PAR : Pseudo-Autosomal Region
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEO : Progressive External Ophthalmoplegia
PGC : Primordial Germ Cell
PMA : Procréation Médicalement Assistée
POLG1 : POLymérase Gamma 1
PRY : PTPBL-Related gene on Y
PTP : Pore de Transition de Perméabilité
PTP-BL : Protein Tyrosine Phosphatase BAS Like
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RNS : Reactive Nitrogen Species
RT-QPCR : Real Time - Quantitative Polymerase Chain Reaction
SAM : S-Adénosyl-Méthionine
SMCY : Selected Mouse cDNA on the Y
SN-BER : Single Nucleotide-Base Excision Repair
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SPATA16 : Spermatogenesis-associated protein 16
SRY : Sex determining Region Y
TBE : Tris-Borate-EDTA
TDF : Testis Determining Factor
TIM : Translocase of the Inner Membrane
TNF : Tumor Necrosis Factor
TOM : Translocase of the Outer Membrane
UFC : Unités Formant des Colonies
USP9Y : Ubiquitin-Specific Protease 9 Y chromosome
UTR : UnTranslated Region
UTY : Ubiquitous Tetratricopeptide repeat motif Y
XKRY : XK Related Y

Table des matières

Introduction	01
Partie bibliographique	
La mitochondrie	
I- Origine	04
II- Structure	04
III- Fonctions de la mitochondrie	07
1- Le métabolisme énergétique	08
1-1- La β -oxydation	08
1-2- Le cycle de Krebs	08
1-3- La phosphorylation oxydative	09
2- L'apoptose	10
3- L'homéostasie calcique	10
4- Les espèces réactives de l'oxygène	11
IV- Génome mitochondrial	12
1- Organisation du génome mitochondrial	12
2- Réplication de l'ADN mitochondrial	14
3- Expression des gènes mitochondriaux	14
V- Particularités génétiques	15
1- Transmission maternelle	15
2- Hétéroplasmie et effet de seuil	16
3- Ségrégation mitotique	16
4- Taux de mutation plus élevé que les gènes nucléaires	17
Les maladies mitochondriales	
I- Maladies liées à des mutations dans l'ADNmt	20
1-1- Délétions de l'ADNmt	21
1-2- Mutations ponctuelles de l'ADNmt	22
II- Maladies liées à des mutations du génome nucléaire	22
III- Polymorphisme de l'ADNmt	23
Aspects physiologiques de la fertilité masculine	
I- Appareil génital masculin	24
1- Embryologie	24
2- Anatomie	24
3- Histologie fonctionnelle	25
3-1- Les tubes séminifères	25
3-2- L'espace interstitiel	25
II- La spermatogénèse et spermatozoïdes	27
1- Les différentes étapes de la spermatogénèse	27
2- La structure des spermatozoïdes	28
3- Régulation de la spermatogénèse	29
4- Spermatozoïdes et mitochondries	29

Aspects étiopathologiques de l'infertilité masculine

I- Diagnostic clinique et biologique	30
1- Diagnostic clinique	31
1-1- Interrogatoire	31
1-2- Examen clinique	31
1-3- Échographie de l'appareil uro-génital	31
2- Diagnostic biologique	32
2-1- Spermogramme	32
2-2- Spermoculture	32
2-3- Bilan hormonal	32
II- Classification	33
1- Infertilités obstructives (excrétoires)	33
1-2- L'infertilité obstructive congénitale	33
1-2- L'infertilité obstructive acquise.....	33
2- Infertilités non obstructives (sécrétoires).....	33
2-1- L'infertilité non obstructive centrale	33
2-2- L'infertilité non obstructive testiculaire	34
III- Étiologie	34
1- Les causes endocriniennes	34
2- Les maladies infectieuses	34
3- Les problèmes immunitaires	35
4- Les causes environnementales	35
4-1- Les effets de la chaleur	35
4-2- La pollution industrielle	35
4-3- Les effets des ondes et radiations ionisantes	36
4-4- Effets de l'alimentation	36
4-5- Consommation d'alcool, tabac et substances illicites.....	36
4-6- Autres causes	37
Génétique de l'infertilité masculine	
I- Le chromosome Y	38
1- Cartographie structurale	38
2- Cartographie génique	39
II- Anomalies génétiques et infertilité masculine	40
1- Les anomalies chromosomiques	41
2- Microdélétions du chromosome Y	41
3- Le gène <i>CFTR</i>	42
III- Polymorphismes géniques et infertilité masculine	43
1- L'ADN polymérase gamma γ (<i>POLG1</i>)	43
2- Le cytochrome P450 1A1 (<i>CYP1A1</i>)	46
3- La 5-10 Méthylène Tétra-Hydro-Folate Réductase (<i>MTHFR</i>)	48
4- Autres gènes impliqués dans l'infertilité masculine	52
IV- Mitochondrie et infertilités masculines	53
1- Implication de la mitochondrie dans la fertilité masculine	53
2- Mutations de l'ADNmt et infertilité masculine	54
2-1- Modifications qualitatives	54
2-2- Modifications quantitatives	55

Partie pratique

Patients et méthodes

I- Patients et témoins	56
1- Patients	56
2- Témoins	56
II- Méthodologie	57
1- Analyse hormonale	57
2- Analyse cytologique (spermogramme)	57
3- Analyse génétique	57
3-1- Extraction d'ADN à partir de sang total	58
3-2- Détermination de la concentration, la pureté et de la qualité de l'ADN extrait	58
3-3- Séquençage de la <i>POLG1</i> (screening de l'exon 2)	59
3-3-1- Amplification de l'exon 2	59
3-3-2- Migration sur gel d'agarose	61
3-3-3- Purification des produits de PCR (AMPure®)	62
3-3-4- Préparation des plaques de séquences (réaction de séquençage)	63
3-3-5- Purification des produits de séquençage (CleanSEQ®)	64
3-3-6- Séquençage des plaques sur l'appareil	64
3-4- Génotypage du <i>CYP1A1</i>	65
3-4-1- Amplification de la région 3' non codante du <i>CYP1A1</i>	65
3-4-2- Digestion et migration sur gel d'agarose	66
3-5- Génotypage de la <i>MTHFR</i>	68
3-5-1- Amplification de l'exon 7 de la <i>MTHFR</i>	68
3-5-2- Digestion et migration sur gel d'agarose	69
3-6- PCR longue de l'ADNmt	70
3-6-1- Amplification de l'ADNmt	70
3-6-2- Migration sur gel d'agarose	72
3-7- PCR quantitative en temps réel	73
4- Analyse statistique	76
4-1- Etude cas-témoins	76
4-2- Analyse statistique des résultats de la PCR quantitative	79

Résultats et discussions

I- Dosage des acides nucléiques	81
II- Génotypage de la <i>POLG1</i> ((CAG)n) et screening de l'exon 2	81
III- Génotypage du <i>CYP1A1</i> (T3801C)	94
IV- Génotypage de la <i>MTHFR</i> (A1298C)	104
V- PCR longue de l'ADNmt	114
VI- PCR quantitative	118
Discussion générale	129
Conclusion et perspectives	136
Références bibliographiques	138

Liste des figures

Figure 01 :	Structure de la mitochondrie.....	06
02 :	Représentation schématique de l'organisation de la chaîne respiratoire mitochondriale humaine	09
03 :	Organisation du génome mitochondrial humain	13
04 :	Particularité des atteintes multi-systémiques des maladies mitochondriales ...	19
05 :	Cartographie morbide de l'ADNmt	20
06 :	Localisation du processus de la spermatogenèse chez l'homme	26
07 :	Représentation schématique des étapes de la spermatogénèse	27
08 :	Cartographie du chromosome Y humain	39
09 :	Identification des régions AZF sur le chromosome Y humain	42
10 :	Représentation schématique du gène <i>CYP11A1</i> avec les caractéristiques des polymorphismes m1, m2, m3 et m4	48
11 :	Schéma de la structure du gène <i>MTHFR</i> et sa protéine avec indications des polymorphismes les plus communs	50
12 :	Représentation schématique du site de restriction de l'enzyme <i>HpaII</i>	67
13 :	Représentation schématique du site de restriction de l'enzyme <i>MboII</i>	69
14 :	Fréquences génotypiques du polymorphisme (CAG) _n de la <i>POLG1</i>	84
15 :	Fréquences alléliques du polymorphisme (CAG) _n de la <i>POLG1</i>	84
16 :	Représentation graphique des fréquences génotypiques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme (CAG) _n de la <i>POLG1</i>	88
17 :	Représentation graphique des fréquences alléliques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme (CAG) _n de la <i>POLG1</i>	89
18 :	Fréquences génotypiques du polymorphisme T3801C du <i>CYP11A1</i>	96
19 :	Fréquences alléliques du polymorphisme T3801C du <i>CYP11A1</i>	96

20 :	Représentation graphique des fréquences génotypiques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme T3801C du <i>CYP11A1</i>	100
21 :	Représentation graphique des fréquences alléliques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme T3801C du <i>CYP11A1</i>	101
22 :	Fréquences génotypiques du polymorphisme A1298C de la <i>MTHFR</i>	106
23 :	Fréquences alléliques du polymorphisme A1298C de la <i>MTHFR</i>	106
24 :	Représentation graphique des fréquences génotypiques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme A1298C de la <i>MTHFR</i>	110
25 :	Représentation graphique des fréquences alléliques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme A1298C de la <i>MTHFR</i>	111
26 :	Représentation graphique des résultats du test de <i>Shapiro-Wilk</i> pour les infertiles	119
27 :	Représentation graphique des résultats du test de <i>Shapiro-Wilk</i> pour les AZOs	120
28 :	Représentation graphique des résultats du test de <i>Shapiro-Wilk</i> pour les OATs	120
29 :	Représentation graphique des résultats du test de <i>Shapiro-Wilk</i> pour les ASTs	121
30 :	Représentation graphique des résultats du test de <i>Shapiro-Wilk</i> pour les témoins	121

Liste des photographies

Photo 01 :	Analyse par RFLP du polymorphisme T3801C du <i>CYP11A1</i> sur un fragment de PCR digéré par <i>HpaII</i>	67
02 :	Analyse par RFLP du polymorphisme A1298C de la <i>MTHFR</i> sur un fragment de PCR digéré par <i>MboII</i>	70
03 :	Profil électrophorétique d'amplicons XL1/XL2 de l'ADNmt obtenus par PCR longue	73
04 :	Profil électrophorétique d'amplicons OF/BR de l'ADNmt obtenus par PCR longue	73
05 :	Résultats de la PCR des produits d'amplification 2.1 pour les infertiles ...	82
06 :	Résultats de la PCR des produits d'amplification 2.2 pour les infertiles ...	82
07 :	Résultats de la PCR des produits d'amplification 2.1 pour les témoins	83
08 :	Profil de restriction des produits de l'amplification partielle de la région 3' non codante du gène <i>CYP11A1</i> après digestion par <i>HpaII</i>	95
09 :	Profil de restriction (1) des produits de l'amplification partielle de l'exon 7 du gène de la <i>MTHFR</i> après digestion par <i>MboII</i>	105
10 :	Profil de restriction (2) des produits de l'amplification partielle de l'exon 7 du gène de la <i>MTHFR</i> après digestion par <i>MboII</i>	105
11 :	Profil de migration des amplicons XL1/XL2 de l'ADNmt pour une série d'infertiles en présence du marqueur III	115
12 :	Profil de migration des amplicons OF/BR de l'ADNmt pour une série d'infertiles en présence du marqueur III	115

Liste des tableaux

Tableau 01 :	Bases génétiques de l'infertilité masculine ; recueil des gènes dont l'implication a été démontrée lors d'études publiées précédemment (liste non exhaustive)	52
02 :	Composition de la population d'étude.....	56
03 :	Séquences des amorces utilisées pour la PCR de l'exon 2 de la <i>POLG</i>	60
04 :	Composition du milieu réactionnel de la PCR pour l'amplification de l'exon 2 de la <i>POLG1</i>	60
05 :	Programme du thermocycleur pour l'amplification de l'exon 2 de la <i>POLG1</i>	61
06 :	Séquences des amorces utilisées pour la vérification de la délétion de <i>POLG1</i>	62
07 :	Composition du milieu réactionnel de séquençage de l'exon 2 de la <i>POLG1</i>	63
08 :	Programme du thermocycleur pour la réaction de séquençage	64
09 :	Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de la région 3' non codante du <i>CYP11A1</i>	65
10 :	Composition du milieu réactionnel de la PCR pour l'amplification de la région 3' non codante du <i>CYP11A1</i>	66
11 :	Programme du thermocycleur pour l'amplification de l'amplification de la région 3' non codante du <i>CYP11A1</i>	66
12 :	Séquences des amorces utilisées pour l'amplification partielle de l'exon 7 de la <i>MTHFR</i>	68
13 :	Composition du milieu réactionnel de la PCR pour l'amplification partielle de l'exon 7 de la <i>MTHFR</i>	68
14 :	Programme du thermocycleur pour l'amplification partielle de l'exon 7 de la <i>MTHFR</i>	69
15 :	Séquences des amorces utilisées pour la PCR longue de l'ADNmt ...	71

16 :	Composition du milieu réactionnel de la PCR longue de l'ADNmt ...	71
17 :	Programme du thermocycleur pour l'amplification de l'ADNmt lors de la PCR longue	72
18 :	Séquences des amorces utilisées pour la PCR quantitative	74
19 :	Composition du milieu réactionnel de la PCR quantitative.....	74
20 :	Organisation de la plaque de la PCR quantitative pour <i>ATP Synthase β /ND2</i>	75
21 :	Programme du thermocycleur pour l'amplification Q-PCR	76
22 :	Tableau de contingence croisé.....	77
23 :	Formulation des différents modèles de comparaison pour l'étude de l'effet de l'allèle $\neq 10$ (infertiles/témoins)	78
24 :	Résultat du dosage de l'ADN extrait ainsi que la détermination des rapports 260/280 et 260/230 pour notre population d'étude	81
25 :	Résultats de l'analyse statistique de l'effet du polymorphisme (CAG) _n de la <i>POLG1</i> établie par le test du χ^2 (infertiles et témoins)	85
26 :	Résultats de l'analyse statistique de l'effet du polymorphisme (CAG) _n de la <i>POLG1</i> établie par le test du χ^2 (sous-groupes d'infertiles et témoins)	86
27 :	Recueil des fréquences génotypiques et alléliques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme (CAG) _n de la <i>POLG1</i>	87
28 :	Résultats de l'analyse statistique du polymorphisme T3801C du <i>CYP11A1</i> établie par le test du χ^2 (infertiles et témoins)	97
29 :	Résultats de l'analyse statistique du polymorphisme T3801C du <i>CYP11A1</i> établie par le test du χ^2 (sous-groupes d'infertiles et témoins)	98
30 :	Recueil des fréquences génotypiques et alléliques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme T3801C du <i>CYP11A1</i>	99
31 :	Résultats de l'analyse statistique du polymorphisme A1298C de la <i>MTHFR</i> établie par le test du χ^2 (infertiles et témoins)	107
32 :	Résultats de l'analyse statistique du polymorphisme A1298C de la <i>MTHFR</i> établie par le test du χ^2 (sous-groupes d'infertiles et témoins)	108

33 :	Recueil des fréquences génotypiques et alléliques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme A1298C de la <i>MTHFR</i>	109
34 :	Résultat du test de <i>Shapiro-Wilk</i> appliqué à notre population d'étude	122
35 :	Résultat du test de <i>Student</i> appliqué à notre population d'étude	123
36 :	Résultat du test de <i>Brown-Forsyth</i> appliqué à notre population d'étude	124
37 :	Résultat du test de <i>Kruskal-Wallis</i> appliqué à notre population d'étude	125
38 :	Récapitulatif des études ayant prospecté la signification du taux d'ADNmt leucocytaire	126

Introduction

L'ensemble des activités cellulaires décrites jusqu'à présent, qu'elles soient métaboliques, osmotiques ou mécaniques, consomment de l'énergie sous forme de molécules d'Adénosine Tri-Phosphates (ATP) produites par la mitochondrie, qui occupent une place primordiale au sein du métabolisme énergétique. Les mitochondries sont impliquées dans des processus cellulaires clefs notamment l'apoptose, l'homéostasie calcique ainsi que la production des radicaux libres, sous forme d'Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs), elles constituent également une importante composante des voies de biosynthèse des lipides, protéines et nucléotides (**Harper *et al.*, 2013**).

Du fait du rôle central de la mitochondrie dans la cellule, toute perturbation de son fonctionnement est susceptible d'avoir un retentissement grave. Elle doit être finement régulée pour répondre aux différents besoins des différentes cellules où elle se trouve. Une défaillance fonctionnelle peut être à l'origine de pathologies (**Alberts *et al.*, 2002**).

Les maladies mitochondriales ont l'originalité génétique d'être dues à des altérations de gènes portés par les chromosomes nucléaires ou à celles de gènes de l'ADN mitochondrial (ADNmt). Elles affectent principalement les organes à fort besoin énergétique comme le système nerveux, les muscles ou les organes neurosensoriels (**Rötig et Munnich, 2003**). Outre ces pathologies génétiques, un dysfonctionnement mitochondrial est souvent évoqué dans de nombreuses maladies métaboliques ou dégénératives, notamment liées à l'âge (**Schapira, 2012**).

La mitochondrie est le seul organite intracellulaire extranucléaire à posséder son propre génome, qui s'accompagne de toute la machinerie de transcription et de traduction des gènes mitochondriaux. Il y a plusieurs copies de l'ADNmt dans chaque mitochondrie, variant selon la taille et le nombre des mitochondries. Cet ADN comporte 37 gènes qui codent pour 13 protéines, 22 Acide Ribo-Nucléique de transfert (ARNt) et 2 Acide Ribo-Nucléique ribosomiaux (ARNr). De fait, la plupart des protéines mitochondriales sont codées par des gènes nucléaires, synthétisées dans le cytosol puis importées à l'intérieur de la matrice (**Larsson et Clayton, 1995**).

L'implication des mitochondries dans la reproduction humaine est une notion relativement récente qui suscite un intérêt scientifique et médical croissant. Ces organites peuvent influencer la qualité des ovocytes et des spermatozoïdes, mais aussi la fécondation et le développement embryonnaire (**May-Panloup *et al.*, 2004**).

La mitochondrie joue indéniablement un rôle important dans les processus de maturation gamétique, de fécondation et de développement embryonnaire. Des anomalies tant qualitatives que quantitatives de l'ADNmt ont été associées à des troubles de la fertilité masculine. Des altérations de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales peuvent aussi être impliquées.

Ainsi, certains phénotypes d'infertilité masculine ont été associés à des polymorphismes de l'ADN polymérase γ spécifique de la réplication de l'ADNmt (Amaral *et al.*, 2013).

Des anomalies de la fonction mitochondriale, intervenant à tous les stades de la reproduction, sont susceptibles de rendre compte d'une part non négligeable des troubles de la fertilité humaine. L'analyse des mécanismes moléculaires mis en jeu dans la régulation de la biogenèse et du métabolisme mitochondrial devrait ainsi permettre d'améliorer notre compréhension de la physiologie de la reproduction (Jansen *et al.*, 2004).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'infertilité est définie comme l'incapacité pour un couple de procréer après une année au moins de rapports sexuels non protégés. Dans un tiers des cas environ, la cause est plutôt féminine, dans un tiers des cas plutôt masculine, et dans un tiers des cas, elle concerne les deux partenaires. On estime de par le monde, environ 15 % des couples sont confrontés à cette complication (OMS, 1999 ; 2010). Selon une étude publiée en 2007, la prévalence mondiale de l'infertilité serait toutefois plus proche de 9 %, ce qui concerne tout de même près de 70 millions de couples (Boivin *et al.*, 2007). Ces statistiques inquiétantes permettent de considérer l'infertilité comme un problème social majeur et un enjeu important de santé.

Les causes de l'infertilité masculine sont nombreuses et multi-factorielles, on distingue les formes sécrétoires, les plus fréquentes, accompagnées d'un défaut de la spermatogenèse, et les formes excrétoires empêchant l'excrétion des spermatozoïdes. Ces deux présentations peuvent parfois être associées. Parmi les causes génétiques, les anomalies chromosomiques, les microdélétions du chromosome Y et les mutations du gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Trans-membrane conductance Regulator) sont bien établies (Coutton *et al.*, 2012).

Des investigations clinico-biologiques et moléculaires poussées permettent d'attribuer environ 30 % des cas d'azoospermies (absence totale de spermatozoïdes) et d'oligozoospermies (quantité anormalement réduite de spermatozoïdes) à des anomalies chromosomiques ou à des mutations touchant des gènes intervenant dans la production et/ou la fonction des cellules germinales. Cependant et malgré les percées scientifiques majeures dans ce domaine, 30 % des infertilités restent inexplicables et près de 40 % ont des causes incertaines (Tahmasbpour *et al.*, 2014).

Ces chiffres permettent de suggérer l'implication vraisemblable d'autres gènes, encore inconnus, dans les différentes formes d'infertilité masculine. On estime qu'entre 1500 et 2000 gènes interviennent dans le contrôle de la spermatogenèse, parmi lesquels 300 à 600 sont spécifiquement exprimés dans les cellules germinales masculines. On s'attend donc logiquement à ce que des anomalies de ces gènes perturbent la fertilité masculine (Coutton *et al.*, 2012).

De plus, l'augmentation des cas au sein d'une même fratrie ayant un phénotype d'infertilité (formes familiales) suggère l'implication importante de la composante génétique dans les formes inexplicables. De nombreuses études rapportent l'association suspectée d'un ou plusieurs polymorphismes nucléotidiques dans une population d'hommes infertiles par rapport à une population témoin (Ferlin *et al.*, 2006 ; Poongothai *et al.*, 2009 ; Hwang *et al.*, 2010).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'analyse des gènes susceptibles d'interférer dans la fonction de reproduction masculine.

Dans ce contexte, et dans une première partie, nous réaliserons une étude transversale de type cas-témoins par l'analyse génétique et statistique de plusieurs polymorphismes. Après une recherche bibliographique rigoureuse, nous avons sélectionné trois polymorphismes potentiellement intéressants, dont on étudiera les fréquences dans deux cohortes indépendantes d'hommes infertiles et de témoins pour déterminer l'éventuelle association entre les différents génotypes observés et le dysfonctionnement étudié :

- ***POLG1 (POLYmerase Gamma-1)*** pour le polymorphisme de répétition des triplets CAG ainsi que les mutations et/ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism) qu'y sont associées par séquençage de l'exon 2.
- ***CYPA1A (CYtochrome P450 1A1)*** pour le polymorphisme T3801C par PCR/RFLP (Polymerase Chain Reaction / Restriction Fragment Length Polymorphism).
- ***MTHFR (5-10 Méthylène Tétra-Hydro-Folate Réductase)*** pour le polymorphisme A1298C par PCR/RFLP.

Dans une deuxième partie, nous compléterons l'étude précédente par une approche basée sur une évaluation qualitative et quantitative de l'ADNmt par des méthodes d'investigations performantes spécialisées :

- **Qualitative** : par PCR longue suivi d'une migration sur gel d'agarose pour rechercher des délétions de l'ADNmt dans une cohorte d'hommes infertiles.
- **Quantitative** : par RT-QPCR (Real Time - Quantitative Polymerase Chain Reaction) pour quantifier l'ADNmt dans les leucocytes d'hommes infertiles et de témoins.

Partie bibliographique

Chapitre I

La mitochondrie

La mitochondrie est un organite cellulaire semi-autonome nécessitant des protéines codées par le génome nucléaire pour fonctionner.

I- Origine :

Mereschkovsky en 1909 a émis, pour la première fois, l'hypothèse de l'origine bactérienne de la mitochondrie. Cette hypothèse, qui fut nommée endosymbiotique, sera revue dans les années soixante-dix par **Margulis (Margulis, 1975)** et confirmée par la comparaison des ARNr. Ainsi, des études de séquences des gènes mitochondriaux ont déterminé que l'ancêtre de la mitochondrie était une α -protéobactérie (subdivision des Rickettsies : *Rickettsia*, *Anaplasma* et *Ehlichia*) (**Anderson et Kurland, 1998**). Il est aujourd'hui largement admis que leurs origine est bactérienne. Suite à l'évènement d'endocytose et au cours de l'évolution, la majorité du contenu génétique de l' α -protéobactérie a été transféré dans le noyau de la cellule hôte. Le génome mitochondrial n'est plus qu'un vestige du génome bactérien. En effet, les génomes mitochondriaux ne contiennent que quelques dizaines de gènes alors que celui des Rickettsies en contient plus de 800 (**Anderson et Kurland, 1998 ; Grey et al., 2001**).

Il est à noter que la persistance d'un génome mitochondrial requiert un nombre considérable de protéines, nécessaire à sa maintenance et son expression, ce qui représente un coût énergétique très important pour la cellule. La cause de la persistance de ce génome n'est pas encore connue ! (**Wallace et al., 2007**).

II- Structure :

Décrites pour la première fois par **Kölliker** et **Flemming** dès le XIX^{ème} siècle, les mitochondries, organelles cytoplasmiques, apparaissent sous forme de granules ovoïdes plus ou moins allongées avec deux aspects typiques : globulaires (de 0,5 à 1 μm) et filamenteux (jusqu'à 10 μm) de long d'où leur appellation, introduite en 1898, avec les mots grecs *mitos* (filaments) et *chondros* (granules). Présente dans toutes les cellules (exception faite des hématies), la morphologie de la mitochondrie est variable d'un tissu à un autre. Il est admis aujourd'hui que ces organites " polymorphes " possèdent une structure plastique et changent souvent de forme par fusion de deux mitochondries ou fission d'une mitochondrie (**Alberts et al., 2002 ; Okamoto et Shaw, 2005**).

Leur nombre variable est proportionnel aux besoins énergétiques du type cellulaire, de quelques dizaines à plusieurs milliers, le compartiment mitochondrial peut occuper une partie conséquente de l'espace cellulaire (20 % dans les cellules hépatiques et jusqu'à 40 % dans les cellules musculaires). Leur demi-vie est de l'ordre de 6 à 10 jours suivant les cellules (**Callen et Perasso, 2005**).

Les mitochondries sont réparties généralement de façon homogène dans le hyaloplasme. Une localisation préférentielle est parfois observée à proximité des zones de haute consommation énergétique et au proche voisinage du noyau où elles apparaissent en couronnes péri-nucléaires. Cette localisation intracellulaire diffère également selon les tissus (**Alberts et al., 2002**).

La description ultra-structurale des mitochondries observées sous microscopie électronique a été émise pour la première fois par **Claude et Fullam** en 1945, ne permettait de conclure que sur la présence d'une membrane l'entourant. En 1956, **Werkheiser et Bartley** postulaient l'hypothèse de l'existence de deux phases aqueuses distinctes, physiquement séparées, à l'intérieur d'une mitochondrie (**Scheffler, 2008**). Ces deux phases sont délimitées par deux membranes de nature et de composition très différentes :

- **Une membrane externe**, uniforme (lisse) et continue, d'épaisseur voisine de 7 nm, de composition semblable à celle de la membrane cytoplasmique (60 % de protéines et 40 % de lipides) perméable à de nombreuses molécules de faible Poids Moléculaire (PM) d'une taille inférieure à 5000 Dalton (Da) (**Popov et al., 2005**). Cependant, des molécules de plus haut PM (> 10 kDa), possédant un signal d'adressage mitochondrial peuvent traverser la membrane par transport actif au niveau de complexes d'importation constitués par une zone d'accolement entre la membrane externe et interne, ce sont des protéines multimériques nommées **TOM (Translocase of the Outer Membrane)**. Cette membrane possède également d'autres systèmes de transport plus spécifiques tels que l'acyl-CoA synthétase nécessaire à l'importation des acides gras (**Herrmann et Neupert, 2000**).

- **Une membrane interne**, de composition particulière (80 % de protéines et 20 % de phospholipides). La membrane interne est riche en phosphatidyl-choline et en cardiolipine, ce dernier phospholipide est localisé exclusivement dans la membrane interne des mitochondries des mammifères où il est responsable avec les phosphatidyl-cholines de sa forte imperméabilité. Elle constitue une barrière sélective. Seules certaines petites molécules neutres (O_2 , H_2O , CO_2 et NH_3) qui peuvent diffuser passivement. La plupart des ions et les molécules utilisent un transporteur spécifique pour traverser cette membrane. Ainsi, les principaux transporteurs sont l'ANT (Adenine Nucleotide Translocator) qui échange l'ATP mitochondrial avec l'ADP (Adénosine Di Phosphate) cytosolique, le co-transporteur de Phosphate inorganique (Pi)/proton, le symport pyruvate/proton, la navette du glycérol-3-phosphate, la navette malate/aspartate, le transporteur du citrate, la carnitine-acyl-carnitine translocase. Les protéines sont importées grâce à un système de translocases, les **TIM (Translocase of the Inner Membrane)**. Ces transporteurs fournissent à la matrice les substrats et les enzymes de la chaîne respiratoire (**Lodish et al., 2005**).

- Ces deux membranes délimitent un espace inter-membranaire large de 10 à 20 nm dont la composition est très proche de celle du cytosol. Il contient une forte concentration en protons qui lui confèrent une charge positive (**figure 1**) (*Alberts et al., 2002*).

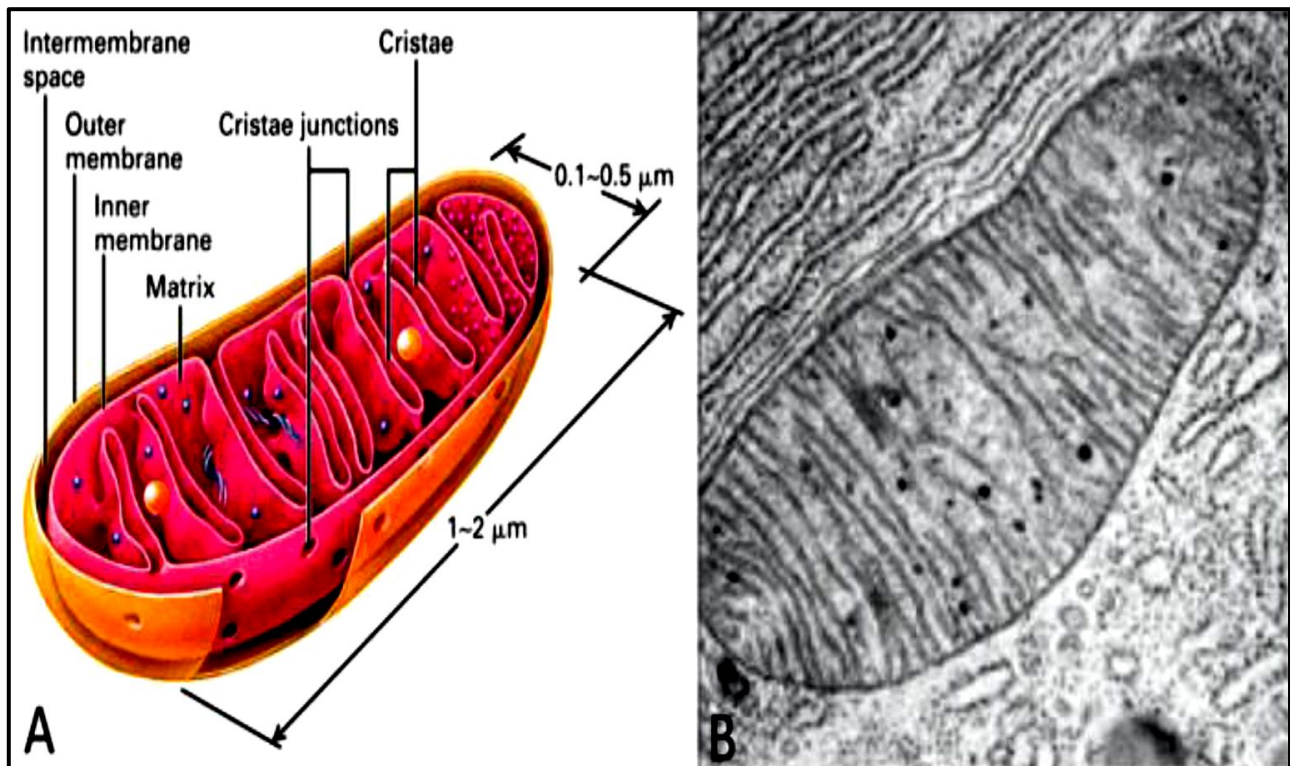


Figure 01 : Structure de la mitochondrie.

A) Représentation schématique de la mitochondrie (*Lodish et al., 2005*).

B) Photographie d'une mitochondrie de cellule hépatique humaine prise sous Microscopie Électronique à Transmission (MET) x 20000 (*Alberts et al., 2002*).

La membrane interne s'invagine et émet des crêtes en continuité avec l'espace inter-membranaire dont le nombre et l'organisation varient en fonction du type cellulaire. Sa surface est donc beaucoup plus étendue que celle de la membrane externe (5 fois plus dans un hépatocyte). Les différents complexes protéiques réalisant la phosphorylation oxydative sont enchâssés dans cette membrane interne (*Popov et al., 2005*).

À l'intérieur, se trouve une matrice mitochondriale siège de nombreuses voies métaboliques. Elle contient plusieurs copies de l'ADNmt ainsi que les éléments nécessaires à sa réplication et à son expression.

La matrice mitochondriale, d'aspect concentré et finement granuleux, contient :

- **Des mito-ribosomes**, apparaissent sous forme de granules opaques de 15 nm de diamètre, plus ou moins nombreuses. Ces structures interviennent dans la synthèse protéique mitochondriale et sont formées à partir du matériel génétique local.
- **Des réserves lipoprotéiques**, granules de grande taille, qui représentent les réserves lipoprotéiques, accumulées par les cellules dans certaines conditions physiologiques.
- **Des cristaux protéiques**, de forme géométrique, avec un réseau très régulier, et envahissant parfois complètement la matrice ; ils traduisent l'accumulation d'un nombre limité de protéines.
- **Des cristaux de substances minérales**, généralement des phosphates de Ca^{2+} ou de Mg^{2+} (souvent accumulés dans des conditions pathologiques).
- **Des molécules d'ADNmt organisées en nucléoïde (Mannella *et al.*, 2006).**

Cette conception schématique de la mitochondrie n'exclut pas l'aspect dynamique de cet organe : les mitochondries entretiennent d'étroites relations avec les autres constituants cellulaires, et d'étroites relations les unes avec les autres mises en avant par les études de fissions et fusions faisant présager une structure en réticulum ou « chondriome » (Jendrach *et al.*, 2008).

Chez la majorité des cellules eucaryotes, les mitochondries constituent des réseaux dont la forme et la taille varient selon les conditions environnementales. Ainsi, la forme du réseau dépend de l'équilibre entre les phénomènes de fusion et de fission. Un déséquilibre du côté de la fission conduit à la fragmentation du réseau, tandis que du côté de la fusion cela conduit à l'élongation et à une forme allongée et interconnectée. Ces événements jouent des rôles importants dans le maintien de l'intégrité et le renouvellement des mitochondries ainsi que dans la ségrégation et la protection de l'ADNmt. Le dysfonctionnement des processus de fusion et de fission est impliqué dans la pathogénicité des maladies mitochondriales (Hollenbeck et Saxton, 2005).

III- Fonctions de la mitochondrie :

Véritable centrale énergétique de la cellule, la mitochondrie est le siège des voies métaboliques terminales de dégradation des molécules bioénergétiques (β -oxydation des acides gras et cycle de Krebs) et de la phosphorylation oxydative. Elle participe également dans des processus cellulaires clefs notamment l'apoptose, l'homéostasie calcique, le métabolisme des acides aminés, la synthèse lipidique et la production d'EROs. La fonction principale de la mitochondrie est la production d'énergie, réalisée via les oxydations phosphorylantes (Scheffler, 2008).

1- Le métabolisme énergétique :

La mitochondrie produit l'essentiel de l'ATP cellulaire, principal donneur d'énergie libre dans les systèmes biologiques. L'hydrolyse de l'ATP est très exergonique et peut être couplée à de très nombreuses réactions endergoniques au sein de la cellule. La variation d'enthalpie libre lors de la transformation de l'ATP en ADP vaut $-51,8$ kJ/mole. L'ATP est pour cette raison une molécule riche en énergie chimique d'hydrolyse, mais qui ne doit pas être considérée pour autant comme une réserve énergétique car la demi-vie de l'ATP est d'environ une minute alors que les besoins quotidiens pour un homme adulte sont estimés à 70 kg ; le taux de renouvellement de cette molécule est très important (**Houten et Wanders, 2010**).

1-1- La β -oxydation :

Les acides gras, stockés dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides, sont libérés par l'action de lipases puis activés en acyl-coenzyme A (acyl-CoA) par l'acyl-CoA synthétase, en présence d'ATP et de coenzyme A. Les acides gras activés doivent ensuite pénétrer dans la matrice mitochondriale pour y être dégradés. Ce transport se fait par simple diffusion pour les acides gras à chaîne courte ou moyenne. Pour les acides gras à longue chaîne, un mécanisme de transport spécifique est nécessaire. Dans la matrice mitochondriale, les acyl-CoA sont dégradés par un cycle récurrent de réactions : la β -oxydation.

La première étape est une oxydation liée au FAD (Flavine Adénine Dinucléotide). Les trois réactions suivantes correspondent à une hydratation, une oxydation liée au NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et une réaction de thiolyse par le groupe thiol d'une molécule de coenzyme A. Cette dernière, catalysée par la β -cétotliolase, libère une molécule d'acétyl-CoA et un acyl-CoA amputé de 2 atomes de carbone. À chaque cycle, la chaîne est réduite de 2 carbones produisant de l'acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs ainsi que 2 coenzymes réduits NADH et FADH₂ (**Kompare et Rizzo, 2008**).

1-2- Le cycle de Krebs :

Le cycle de Krebs est la voie terminale d'oxydation des molécules énergétiques (acides aminés, acides gras et glucides). La plupart de ces molécules entrent dans le cycle sous forme d'acétyl-CoA. Les réactions du cycle de Krebs s'effectuent dans la matrice mitochondriale. Les étapes d'oxydation du cycle de Krebs produisent des équivalents réducteurs qui sont acceptés par le NAD et le FAD. Chaque cycle produit ainsi 3 NADH et un FADH₂. Les coenzymes réduits, NADH et FADH₂, produits par la β -oxydation et le cycle de Krebs transfèrent ensuite leurs équivalents réducteurs à la Chaîne Respiratoire Mitochondriale (CRM) (**Lanza et Nair, 2010**).

1-3- La phosphorylation oxydative :

Le système d'oxydation phosphorylante est composé de 5 complexes enzymatiques localisés dans la membrane mitochondriale interne. Les complexes I à IV constituent la chaîne respiratoire dont la fonction est de transférer les électrons fournis par les coenzymes réduits, NADH et FADH₂ jusqu'à l'oxygène moléculaire en utilisant de multiples centres d'oxydo-réduction : flavines, complexes Fer-Soufre, hèmes ainsi que les ions cuivre. Les électrons fournis par le NADH entrent dans la CRM au niveau du complexe I et ceux fournis par le FADH₂ au niveau du complexe II. Ces quatre complexes enzymatiques sont connectés par des transporteurs mobiles d'électrons : l'ubiquinone qui fait le lien entre les complexes I et II et le complexe III, le cytochrome c qui fait le lien entre le complexe III et le complexe IV. Le transfert des électrons le long de la CRM est couplé à une translocation de protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire (Houten et Wanders, 2010). Le cinquième complexe enzymatique, l'ATP synthase, intervient dans la dissipation du gradient de protons formé précédemment et qui couple le retour des protons vers la matrice mitochondriale à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi. L'oxygène, accepteur final d'électrons, est alors réduit en eau (figure 2) (Gnaiger et al., 2003).

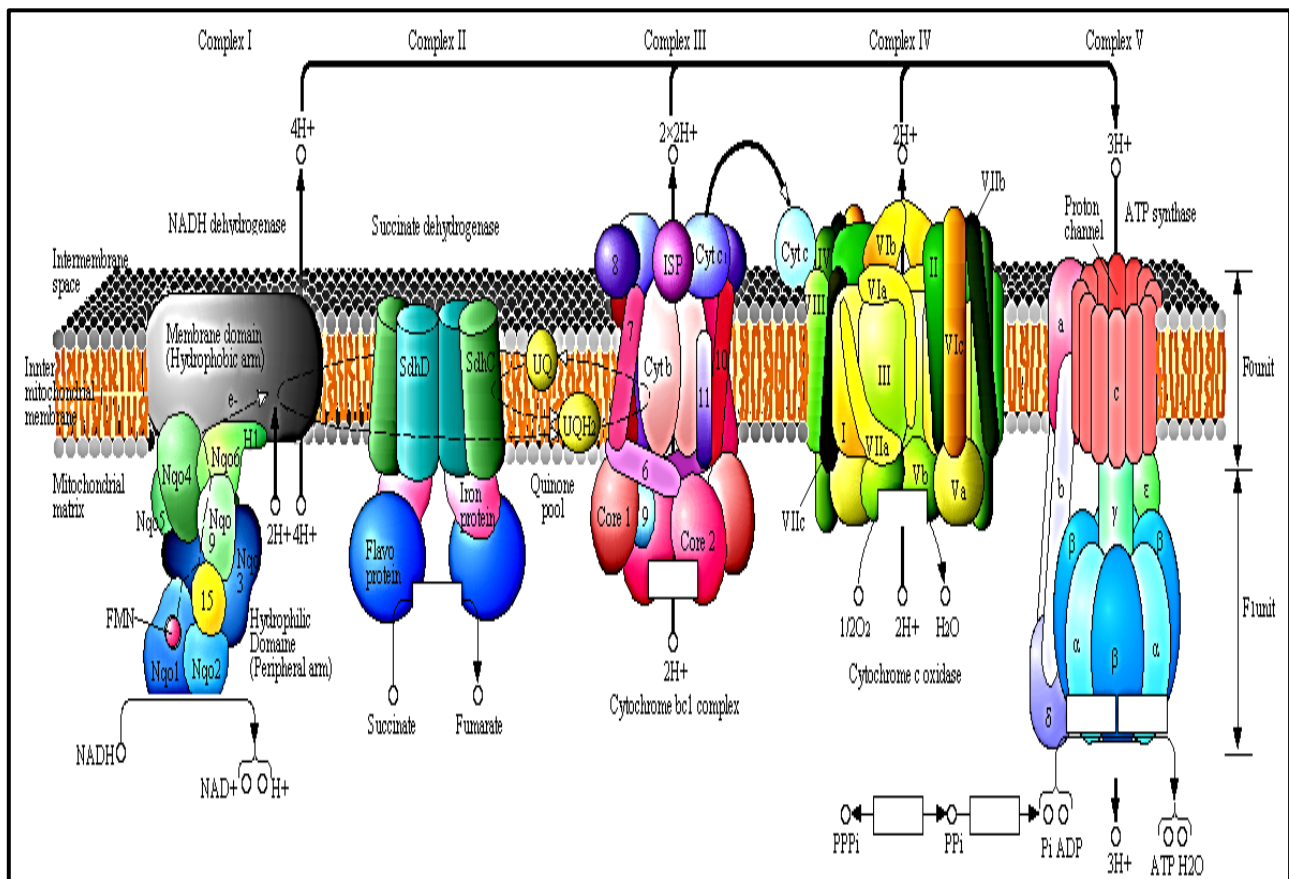


Figure 02 : Représentation schématique de l'organisation de la chaîne respiratoire mitochondriale humaine (Gabaldon et Huynen, 2005).

2- L'apoptose :

L'apoptose est un processus de mort cellulaire actif génétiquement programmé dont il existe deux voies distinctes : la voie extrinsèque (nommée aussi voie des récepteurs de mort) et la voie intrinsèque (dite mitochondriale). Cette voie consiste en la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale qui mène à la libération dans le cytosol de molécules situées initialement dans l'espace inter-membranaire, capables d'initier et de réguler l'activation des caspases susceptibles de cliver plusieurs substrats cellulaires (**Wang et Youle, 2009**).

Deux mécanismes de perméabilisation de la membrane externe sont proposés. Le premier consiste en l'ouverture d'un canal, le Pore de Transition de Perméabilité (PTP) qui permet la dilatation de la matrice et la rupture de la membrane externe. Le second implique la formation d'un pore au niveau de la membrane externe par des protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Bax et Bak) (**Grimm et Brdiczka, 2007**). La création de ces pores conduit à la libération de différents facteurs pro-apoptotiques dont le cytochrome c et l'endonucléase G. Une fois libérées, ces protéines transloquées au niveau du noyau vont participer à la condensation et à la fragmentation de la chromatine (**Riedl et Salvesen, 2007**).

3- L'homéostasie calcique :

La régulation calcique fait intervenir des phénomènes d'extrusion et de séquestration du calcium via des canaux au niveau de la membrane plasmique, du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie (**Kann et Kovacs, 2007 ; Baughman et al., 2011**).

Le calcium localisé dans la matrice, régule les fonctions mitochondriales en participant à la production d'ATP, au contrôle redox et à l'apoptose. Des élévations de la concentration calcique mitochondriale stimule l'activité des déshydrogénases du cycle de Krebs et celle des complexes IV et V de la chaîne respiratoire. L'entrée du calcium du cytosol vers la mitochondrie nécessite un potentiel de la membrane mitochondriale élevé (**Brookes et al., 2004**).

La sortie du calcium de la mitochondrie se fait probablement par l'antiport $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ NCLX/NCX et par le pore de transition membranaire dont l'ouverture est réalisée dans des conditions apoptotiques (**Palty et al., 2010**).

4- Les espèces réactives de l'oxygène :

Les EROs représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires ou radicaux libres générés par l'organisme, en parallèle des espèces nitrées Reactive Nitrogen Species (RNS). Lors d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la capacité de défense des antioxydants, la balance redox ou homéostasie redox se voit déséquilibrée : on parle alors de stress oxydant. La mitochondrie est le site majeur de production cellulaire des EROs qui peuvent être des radicaux libres (espèces chimiques qui portent un électron célibataire sur leur couche externe) ou des molécules comme l'anion superoxyde (O_2^-) ou l'oxyde nitrique. Ces radicaux libres peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour aller altérer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou encore pour atteindre d'autres cellules. De plus, l'attaque des composants cellulaires organiques engendre la transmission d'une cascade radicalaire, soit à l'intérieur d'une même molécule, soit à l'intérieur d'un même tissu en agissant d'une molécule à une autre. En absence d'équipement antioxydant tissulaire efficace, le phénomène de dégradation connaît une progression rapide, qui, après interaction avec les autres systèmes tissulaires, devient très vite exponentielle.

Deux sites principaux sont responsables de la production mitochondriale des EROs : le complexe I et le complexe III de la chaîne respiratoire (**Turrens *et al.*, 2003**).

La production de l'anion superoxyde au niveau du complexe I serait due à l'addition directe d'un électron à l'oxygène par l'un des 7 centres Fe-S qui composent ce complexe ou de manière indirecte à la réduction de quinones externes. Ces quinones alors sous la forme semi-quinone sont très instables et peuvent réduire l'oxygène en O_2^- . Le groupement Flavine Mono-Nucléotide (FMN) serait également capable de générer l'anion superoxyde. Le complexe I contrôle majoritairement la respiration et la production d'ATP. Ainsi, de nombreuses maladies qui présentent un défaut de phosphorylation oxydative lié à ce complexe sont dues à une mort cellulaire par une production trop importante des EROs et à une diminution des capacités respiratoires dans ces tissus. En outre, des mutations de ce complexe, décrites dans plusieurs maladies neuro-dégénératives, sont responsables d'altérations du développement cérébral et sont impliquées dans des encéphalopathies par une mort neuronale qui survient dans les cerveaux de ces patients (**Nishioka *et al.*, 2010**).

Le complexe III est quant à lui, responsable de la production d' O_2^- par l'intermédiaire du coenzyme Q sous sa forme ubi-semi-quinone. Certains travaux ont récemment révélé que des EROs pouvaient également être générées à partir du complexe II (**Gleason *et al.*, 2011**).

Il existe différents antioxydants de nature variable, qui agissent soit en inhibant la formation des EROs, soit en les piégeant, en les métabolisant ou encore en réparant les dommages oxydatifs occasionnés. Différentes enzymes interviennent dans le métabolisme des EROs (**Sikka, 2001**).

IV- Génome mitochondrial :

1- Organisation du génome mitochondrial :

La mitochondrie possède son propre génome sous forme d'une molécule d'ADN bicaténaire et circulaire. L'ADNmt est particulièrement abondant, puisqu'il peut représenter jusqu'à 1 % de l'ADN cellulaire total (environ 5000 copies d'ADN, soit approximativement 10 exemplaires d'ADN par mitochondrie) (**Thorburn et Dahl, 2001**). Selon le type cellulaire, ces chiffres peuvent varier de façon extrêmement importante. Ainsi, dans la lignée germinale, l'ovocyte mature contiendrait jusqu'à 500 000 copies d'ADNmt (**Barritt *et al.*, 2002**) alors que le spermatozoïde seulement 10 (**May-Panloup *et al.*, 2004**). Ce nombre de copies peut varier également dans certaines situations pathologiques (atteintes du foie et cancers) (**Hofmann *et al.*, 2014**).

Chez l'homme, cet ADN est composé de 16 569 paires de bases (pb) et ne comporte pas d'introns. Sa séquence est entièrement connue (**Anderson *et al.*, 1981 ; Andrews *et al.*, 1999**) et disponible sur le web (www.mitomap.org, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Les deux brins de l'ADNmt peuvent être séparés physiquement en un brin lourd (H : Heavy) riche en bases puriques (Guanine et Adénine) et un brin léger (L : Light) riche en bases pyrimidiques (Cytosine et Thymine). Le génome mitochondrial contient 37 gènes qui codent pour 13 protéines (7 du complexe I, 1 du complexe III, 3 du complexe IV et 2 du complexe V), 22 ARNt et 2 ARNr (12S et 16S). Toutes les protéines codées sont des sous-unités de complexes enzymatiques de la CRM. Les 2 ARNr, 12 protéines et 14 ARNt sont codés par le brin H. Le brin L code quant à lui 8 ARNt et une protéine (ND6) (**figure 3**) (**Andrews *et al.*, 1999**).

La particularité majeure de ce génome haploïde est sa grande compaction (94 % de l'ADNmt est formé de régions codantes). Les 2 brins sont codants et comportent des gènes contigus, dépourvus d'intron, et parfois même chevauchants ou sans codon de terminaison, il reste donc très peu de place pour des séquences régulatrices. Seules 2 régions de l'ADNmt ne sont pas codantes : une séquence de 1122 pb, appelée boucle de déplacement, boucle-D ou D-Loop, qui contient l'origine de réplication du brin H ou HSP (Heavy Strand Promoter) et les promoteurs des brins H et L nécessaires à la transcription poly-cistronique de chacun des deux brins, ainsi qu'une séquence de 30 pb contenant l'origine de réplication du brin L ou LSP (Light Stand Promoter) (**Shapira, 2012**).

La région D-Loop peut être subdivisée en trois domaines : un domaine central, bien conservé appelé CSB (Conserved Sequence Box) dont la fonction est encore inconnue, ainsi que deux domaines périphériques à droite et à gauche, nommés ETAS (Extended Termination Associated Sequences) ou HV1 et HV2, très variables (sujets à un polymorphisme) et dont le taux de mutation est 2 à 10 fois supérieur au reste de l'ADNmt (**figure 3**) (**Kirches *et al.*, 2001**).

La plupart des polymorphismes de l'ADNmt se concentrent sur ces deux régions hypervariables, HV1 et HV2, situées respectivement entre les positions nucléotidiques 16024 et 16365, et 73 et 340 (numérotation CRS (Cambridge Reference Sequence)). Certains nucléotides de HV1 et HV2 mutent plus fréquemment (90 % des mutations n'interviennent que sur 27 % des 340 bases qui constituent la région HV1) et sont appelés "hot-spots" (points chauds) du fait de leur haute instabilité. Un autre segment non codant et polymorphe présentant un intérêt dans l'étude des populations est la région V, située dans l'espace inter-génique *COII/ARNt^{Lys}* (Bandelt *et al.*, 2002).

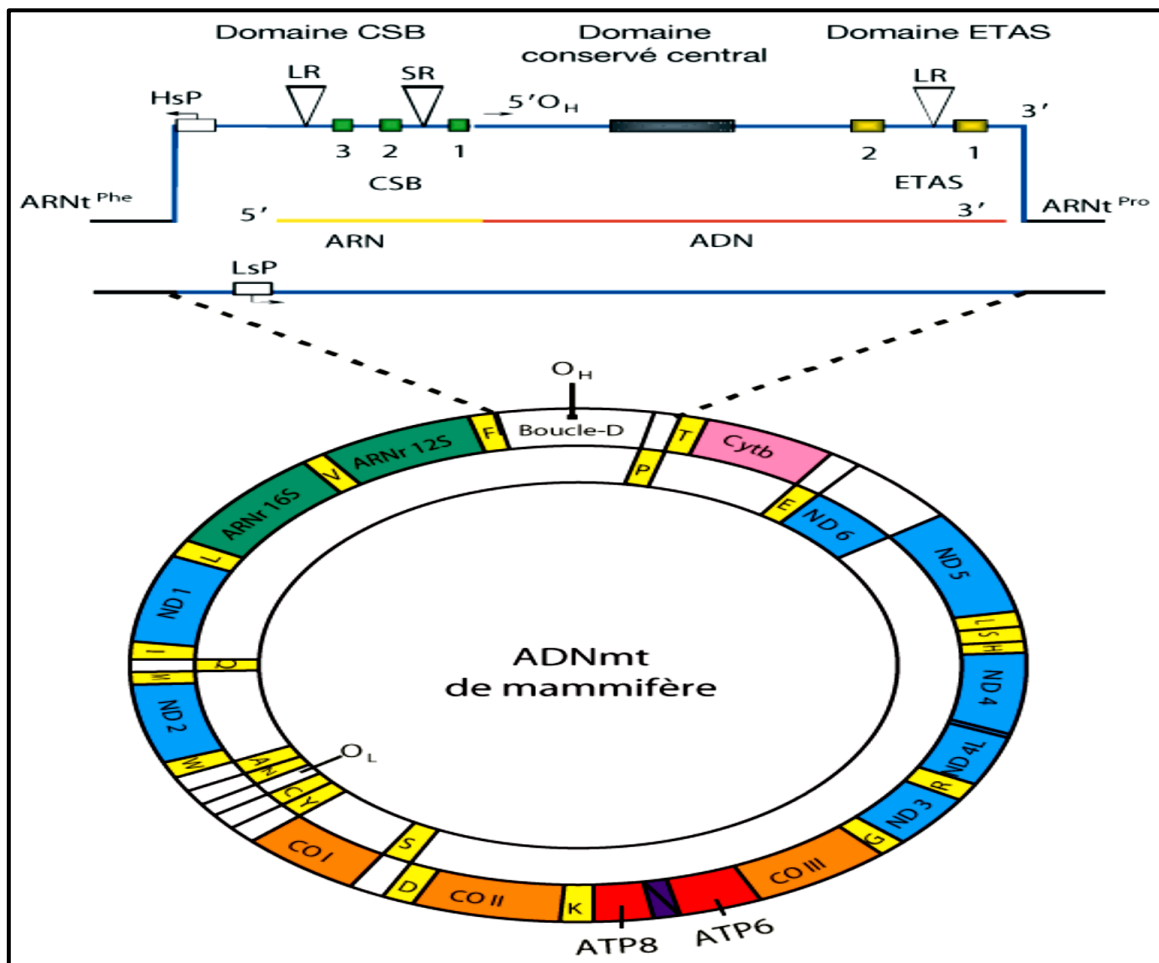


Figure 03 : Organisation du génome mitochondrial humain (Anderson *et al.*, 1981).

Contrairement à ce qu'il a été longtemps pensé, l'ADNmt n'est pas "nu" ni réparti de façon homogène dans la matrice mitochondriale. Il se concentre au niveau de structures spécialisées appelées nucléoïdes de 70 nm de diamètre regroupant chacune de 2 à 10 copies d'ADNmt associées à plusieurs protéines (Legros *et al.*, 2004). D'un point de vue fonctionnel, le nucléoïde représente l'unité de ségrégation de l'ADNmt. Il jouerait un rôle dans sa protection ainsi que dans l'orchestration des mécanismes de la réplication, de la transcription et de la réparation du génome mitochondrial (Bogehagen *et al.*, 2008).

2- Réplication de l'ADN mitochondrial :

Selon le modèle généralement admis, les deux brins H et L de l'ADNmt sont répliqués de manière asynchrone et asymétrique à partir de deux origines distinctes O_H et O_L (Clayton et Robberson, 1972). La réplication fait intervenir une ADN polymérase γ spécifique de la mitochondrie. La réplication de l'ADNmt est initiée par la synthèse du brin H. La première étape est la production d'une amorce ARN par transcription du brin L qui se fait sous le contrôle du facteur de transcription mitochondrial mtTFA (mitochondrial Transcription Factor A). L'amorce ribonucléotidique forme un hybride ARN/ADN stable, appelé R-Loop, au niveau des régions CSBI à III. L'amorce ARN est clivée en aval du CSBI par une ARNase MRP (Mitochondrial RNA Processing). L'ADN polymérase γ prend alors le relais pour synthétiser le néo-brin H (Falkenberg *et al.*, 2007). Différentes enzymes participant à la réplication de l'ADNmt ont été identifiées : une hélicase TWINKLE, des topoisomérases de type I et II et une ADN ligase III (Korhonen *et al.*, 2004).

Généralement, les mitochondries présentes dans les cellules se divisent pendant toute l'interphase, sans synchronisation avec le cycle cellulaire ou avec les autres organites. De même, la réplication de l'ADNmt n'est pas concomitante à la réplication de l'ADN nucléaire lors de la phase S, mais a lieu durant tout le cycle cellulaire.

Il est à préciser que, dans des conditions stables, le nombre de molécules d'ADNmt double à chaque cycle cellulaire afin de conserver une quantité constante de ces molécules (Thevès, 2006).

3- Expression des gènes mitochondriaux :

Chaque brin d'ADNmt est transcrit en un grand ARN poly-cistronique, à la manière des procaryotes. Ce grand transcrit est ensuite clivé par des ARNase spécifiques, au niveau des ARNt, qui ponctuent les gènes structuraux. Puis les Acides Ribo-Nucléiques messagers (ARNm) sont poly-adiénylés, permettant la formation de codons STOP pour les ARN se terminant par U ou UA. Ces ARN sont ensuite traduits suivant un code génétique propre à la mitochondrie. L'ensemble de ces étapes est en grande partie assuré par des protéines nucléaires (Steffann, 2006). Le protéome mitochondrial comprend de 1100 à 1500 protéines. Le génome mitochondrial ne code que 13 de ces protéines correspondant à des sous-unités d'enzymes de la CRM. Toutes les autres protéines sont codées par le génome nucléaire. La biogenèse mitochondriale nécessite donc une très bonne coordination de la transcription des gènes nucléaires et mitochondriaux. La transcription de ces gènes localisés dans deux compartiments cellulaires différents dépend de facteurs de transcription nucléaires. Certains de ces facteurs de transcription sont transloqués dans la mitochondrie, permettant ainsi la transcription bidirectionnelle du génome mitochondrial.

La traduction des ARNm est associée à la membrane interne de la mitochondrie. Bien qu'elle débute par une N-formyl-méthionine et est inhibée par le chloramphénicol (traits typiquement bactériens), cette traduction présente des caractéristiques qui lui sont propres ; la plus intéressante d'entre elles est que le code génétique utilisé possède quelques variations par rapport au code « universel » ; variations qui peuvent être différentes selon les organismes (**Liu et Spremulli, 2000**). Dans le génome mitochondrial de mammifères, le codon stop UGA est décodé par l'ARNt^{Trp}, les codons AUA et AUU (spécifiant l'isoleucine) par l'ARNt^{Met} et les codons AGA et AGG (spécifiant l'arginine) sont des codons stop ; ce qui fait quatre codons stop (au lieu de trois) et quatre codons Arg (au lieu de six). Leurs lectures requièrent aussi une plus grande flexibilité d'interaction entre les ARNt et l'ARNm (puisque'il n'y a que 22 ARNt pour lire 60 codons) qui serait générée soit par une interaction codon/anticodon limitée à deux pb ou à de plus nombreuses possibilités d'interaction du nucléotide en troisième position de l'anticodon de l'ARNt (**Florentz et al., 2003**).

Une autre particularité de la traduction mitochondriale vient de son ribosome. En effet, le ribosome des mitochondries de mammifères est composé d'une petite sous-unité 28S et d'une grande sous-unité 39S. Il est caractérisé par une composition plus faible en ARNr (seulement 33 % contre 66 % dans le ribosome bactérien) et notamment par la perte de certaines régions structurales composées d'ARN. Il est, cependant, intéressant de noter que l'initiation de la traduction ne repose ni sur une séquence de type Shine-Dalgarno (bactéries), ni sur la coiffe en 5' (eucaryotes). La traduction des protéines mitochondriales se ferait quant à elle dans l'environnement proche du nucléoïde, à proximité de la membrane interne, permettant aux protéines naissantes d'être immédiatement incorporées dans les complexes de la CRM (**O'Brien, 2003**).

V- Particularités génétiques :

La localisation cytoplasmique des mitochondries et le nombre de copies élevé de molécules d'ADNmt contribuent à des caractères uniques de la génétique mitochondriale.

1- Transmission maternelle :

La transmission de l'ADNmt est non mendélienne, uniparentale et maternelle. Cela explique la génétique particulière des maladies liées à des altérations du génome mitochondrial définissant un type particulier d'hérédité dite « cytoplasmique ». En effet, après la fécondation, seules les mitochondries issues de l'ovocyte sont conservées et serviront de réserve initiale pour le nouvel individu. Ces mitochondries d'origine maternelle, initialement dispersées dans le cytoplasme sont redistribuées dans le zygote, autour des deux pronucleis. Il ne semble pas y avoir de répllication de l'ADNmt avant l'implantation de l'embryon (**May-Panloup et al., 2004**).

La transmission uniparentale de l'ADNmt, classiquement admise, implique une destruction totale de l'ADNmt spermatique dans l'œuf fécondé qui se produirait au plus tard lors de la troisième division cellulaire embryonnaire (**Sutovsky *et al.*, 1999**).

Le génome mitochondrial paternel ne participe pas au patrimoine génétique de l'embryon. La reconnaissance et la destruction des mitochondries paternelles reposent sur le processus d'ubiquitinylation d'une protéine membranaire mitochondriale (la prohibitine), commencé au cours de la spermatogenèse. En fait, lors du développement des spermatozoïdes, l'ubiquitine liée aux mitochondries spermatiques rend celles-ci promptes à la protéolyse après la fécondation et qui expliquerait pourquoi les mitochondries paternelles ne seraient pas transmises (**Thompson *et al.*, 2003**).

2- Hétéroplasmie et effet de seuil :

Quand une mutation apparaît dans l'ADNmt, elle crée un mélange intracellulaire de molécules mutantes et normales : l'hétéroplasmie. Ce phénomène correspond à la coexistence dans une même cellule de deux espèces d'ADNmt. Cette notion est notamment importante en cas de présence d'une ou plusieurs mutations pathologiques portées par l'ADNmt car en fonction du pourcentage d'ADN muté, l'impact sur le fonctionnement de la CRM et la capacité à produire de l'ATP sera variable.

L'effet de seuil correspond au pourcentage d'ADN muté à partir duquel un tissu ou un organe ne peut plus assurer la production d'énergie minimale permettant de maintenir ses fonctions normales. L'expression phénotypique d'une mutation pathologique de l'ADNmt, au niveau d'un tissu ou d'un organe donné dépendra donc d'une part, de ses besoins énergétiques, et d'autre part, du rapport ADNmt normal/ADNmt muté (**Tsao *et al.*, 2001**).

Différents phénotypes associés avec le même génotype sont principalement déterminés par la concentration et la distribution de la mutation dans les tissus affectés. En effet, les tissus sont différemment dépendants de la phosphorylation oxydative. Les organes avec des besoins élevés en ATP et des capacités régénératrices faibles, tel que le cerveau, le cœur et le muscle squelettique, sont beaucoup plus sensibles aux effets pathogéniques des mutations mitochondriales (**Wallace, 1993**).

3- Ségrégation mitotique :

Lors des divisions cellulaires méiotiques ou mitotiques, chaque cellule contient une centaine de mitochondries, chacune contenant 2 à 10 copies d'ADNmt. Normalement toutes ces molécules sont identiques : l'homoplasmie.

À chaque division cellulaire, les mitochondries et leurs génomes sont distribués de façon supposée « aléatoire » aux cellules filles ; un processus appelé la ségrégation répllicative.

Au cours de l'ovogenèse, le cytoplasme de l'ovocyte subit une croissance phénoménale et son contingent de mitochondries évolue énormément : il subit d'abord une restriction puis une intense amplification. Les ovogonies ne contiennent qu'une dizaine de copies d'ADNmt alors que les ovocytes mûrs en renferment jusqu'à plusieurs dizaines de milliers. Il se produit une expansion clonale à partir d'un très petit nombre d'ADNmt sélectionné, ce qui permet à l'ovocyte de transmettre au nouvel individu une population homoplasmique d'ADNmt. Ceci est attribué à un goulot d'étranglement génétique (**Poulton *et al.*, 1998**). Ce goulot génétique permet normalement d'éliminer les rares formes mutées, sauf dans le cas où la sélection inclurait un ADNmt muté. On observera alors, une accélération d'une éventuelle dérive génétique, avec fixation d'une mutation dans la descendance. Ainsi, en dépit d'un nombre de copies ADNmt élevé dans les ovocytes murs et le nombre relativement limité de divisions dans la lignée germinale femelle, les variants de séquence ADNmt peuvent se séparer rapidement entre les générations. Ce phénomène appelé ségrégation mitotique explique qu'à partir d'un ovule contenant une proportion donnée d'ADN mitochondriaux normaux et mutés, un individu peut avoir des rapports ADN normal / ADN muté très variables dans ses différents tissus et organes. Associé à l'effet de seuil, ce phénomène explique la grande hétérogénéité de l'expression phénotypique des maladies liées à des mutations de l'ADNmt (**Wai *et al.*, 2008**).

4- Taux de mutation plus élevé que les gènes nucléaires :

L'ADNmt est localisé sur la surface de la membrane interne de la mitochondrie, du côté de la matrice, où les EORs peuvent être générées par la CRM. L'exposition prolongée à ces EROs a pour conséquence un niveau élevé de mutations, supérieur à celui des génomes nucléaires. Ce risque est d'autant plus important que lors de la répllication de l'ADNmt celui-ci reste longtemps exposé sous forme simple brin, ce qui le rend particulièrement sensible aux attaques radicalaires.

L'absence de protéines protégeant l'ADNmt (telles que les histones qui sont présentes au niveau de l'ADN nucléaire) ainsi que l'absence de certains des systèmes réparation de l'ADN (système NER (Nucleotide Excision Repair) moins efficace dans la mitochondrie et l'absence probable du système MMR (Mis-Match Repair) si important dans le noyau) contribuent à ce taux de mutation élevé. De plus, un métabolisme mitochondrial anormal pourrait accélérer le taux de mutation ADNmt (**Nachman et Crowell, 2000 ; Larsen *et al.*, 2005**).

Ces caractères spécifiques sont probablement la cause de 10 à 17 fois plus d'accumulation de polymorphismes dans l'ADNmt par rapport à l'ADN nucléaire (**Howell *et al.*, 1996**).

Chapitre II

Les maladies mitochondriales

Les maladies mitochondriales, mitochondriopathies ou cytopathies mitochondriales, rassemblent un groupe hétérogène de pathologies métaboliques avec pour seul dénominateur commun un déficit de la phosphorylation oxydative qui provoque, par accumulation d'équivalents réduits (NADH, FADH₂), une modification profonde des équilibres d'oxydo-réduction cytoplasmiques et mitochondriaux. Ces anomalies peuvent être causées par des mutations, acquises ou héritées, dans la molécule d'ADNmt ou dans les gènes nucléaires codant pour le protéome mitochondrial. Outre le déficit énergétique, la surproduction d'EROs, les déséquilibres redox et une susceptibilité accrue à l'apoptose pourraient participer à la physio-pathologie de ces cytopathies **(DiMauro, 2004 ; Zeviani et Carelli, 2007)**.

Le premier cas de mitochondriopathie a été décrit en 1962 chez une patiente souffrant d'une dérégulation sévère du métabolisme et possédant des mitochondries avec un aspect anormal **(Luft et al., 1962)**. Depuis, leur nombre n'a cessé d'augmenter. Malgré leur multiplicité, les maladies mitochondriales font toutefois partie de la classe des maladies dites « rares ».

Des études épidémiologiques réalisées dans différents pays s'accordent sur une prévalence d'environ 1 sur 5000 et les font considérées ainsi comme les plus fréquentes des maladies métaboliques **(Rötig et Munnich, 2003 ; DiMauro et Schon, 2004 ; Taylor et Turnbull, 2005)**. Cependant, il est fort probable que ce chiffre soit largement sous-estimé de par la difficulté de diagnostiquer ce type de pathologies **(Chabrol, 2011)**.

Les mitochondriopathies peuvent survenir à n'importe quel âge et avec différents modes d'hérédité. De plus, la symptomatologie clinique est très variable, peut être multi-viscérales ou ne toucher qu'un organe isolé. En fait, presque tous les tissus peuvent être atteints même si le déficit prédomine souvent sur les organes les plus consommateurs d'énergie **(figure 4)**. Le tableau clinique va d'une atteinte multi-organes sévère et précoce, avant l'âge d'un an, jusqu'à des symptômes plus discrets ou n'affectant qu'un organe isolé et apparaissant à l'âge adulte et peuvent ainsi se développer par désordres neuro-musculaires, retard mental, diabète, atteintes cardiaques, surdité, cécité et insuffisance hépatique. Les formes les plus sévères, létales, sont en général celles qui se manifestent le plus tôt. *In fine*, les symptômes dépendent de la sévérité du déficit et de sa répartition tissulaire **(Lombes et al., 2013)**.

De par la double origine génétique de la CRM, les mutations engendrant des maladies mitochondriales peuvent être nucléaires : transmission classique ; autosomique dominante, récessive ou lié à l'X, ou mitochondriales matrilineaires **(Rötig et Munnich, 2003)**.

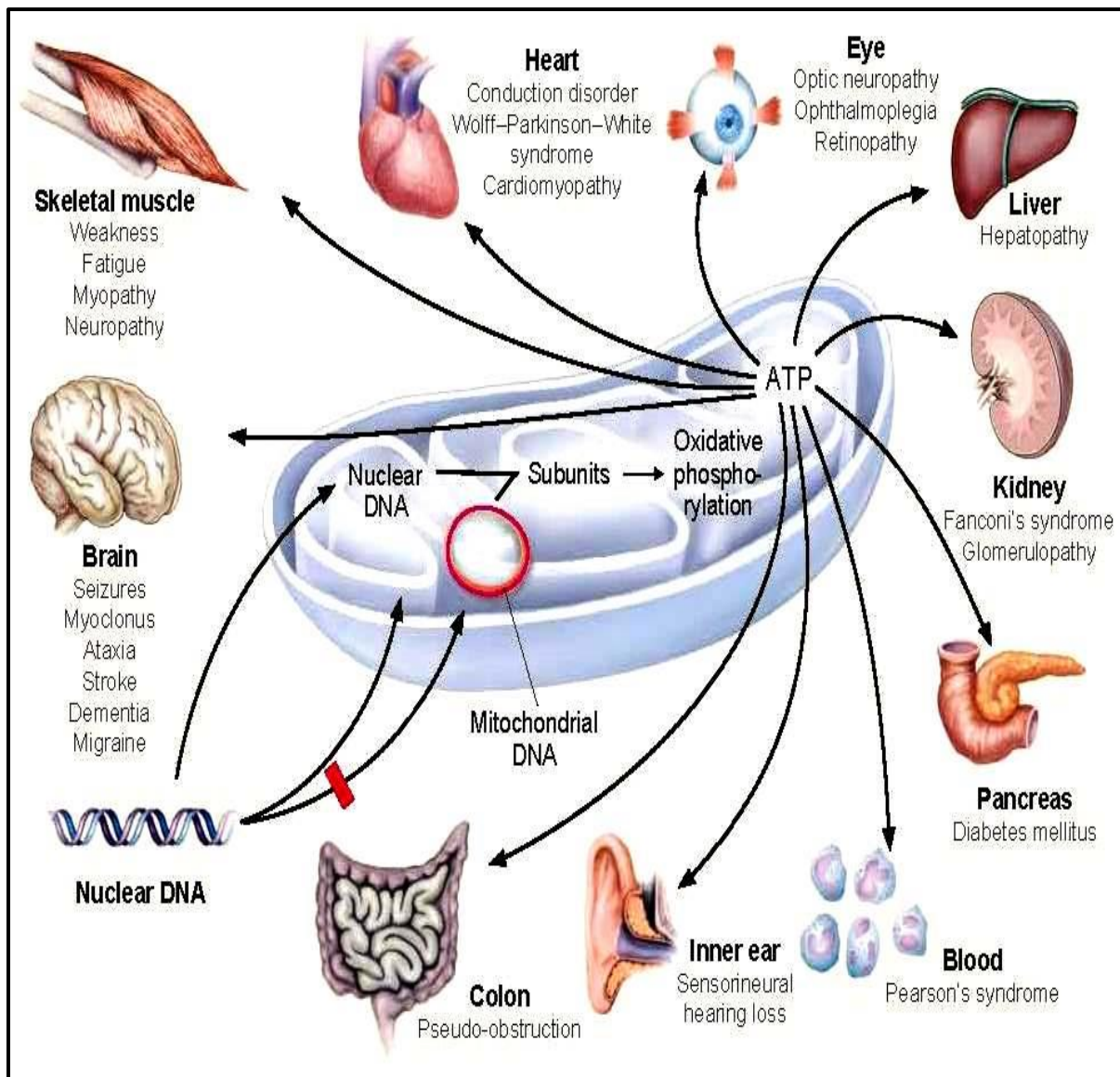


Figure 04 : Particularité des atteintes multi-systémiques des maladies mitochondriales (Johns, 1995).

Les syndromes associés aux maladies mitochondriales décrites dans la littérature sont le résultat du recensement d'un certain nombre de symptômes observés chez la plupart des patients, et souvent accompagnés de manifestations cliniques facultatives. Leur classification est rendue difficile car elle peut se faire sur la base de différentes caractéristiques (manifestations cliniques, type de mutation et mode de transmission). Celle proposée ci-dessous repose en premier sur l'origine mitochondriale ou nucléaire des mutations. Cependant, il convient de préciser qu'un même syndrome pourra être retrouvé dans les deux classes et que des mutations d'origine différente peuvent engendrer des symptômes similaires (Thorburn *et al.*, 2004). Une classification plus exhaustive est disponible sur la base de données en ligne MITOMAP : <http://www.mitomap.org>.

I- Maladies liées à des mutations dans l'ADNmt :

On estime qu'environ 20 % des maladies mitochondriales sont dues à des mutations dans l'ADNmt. La première, correspondant à une délétion, a été décrite en 1988 chez un patient atteint d'une myopathie (**Holt *et al.*, 1988**). À ce jour on en dénombre plus de 200 correspondants à des mutations ponctuelles et à des réarrangements de l'ADNmt (base de données MITOMAP) (**figure 5**). Cette surprenante hétérogénéité trouve partiellement son explication en l'existence de phénomènes génétiques particuliers associés à l'ADNmt (**voir chapitre 1**).

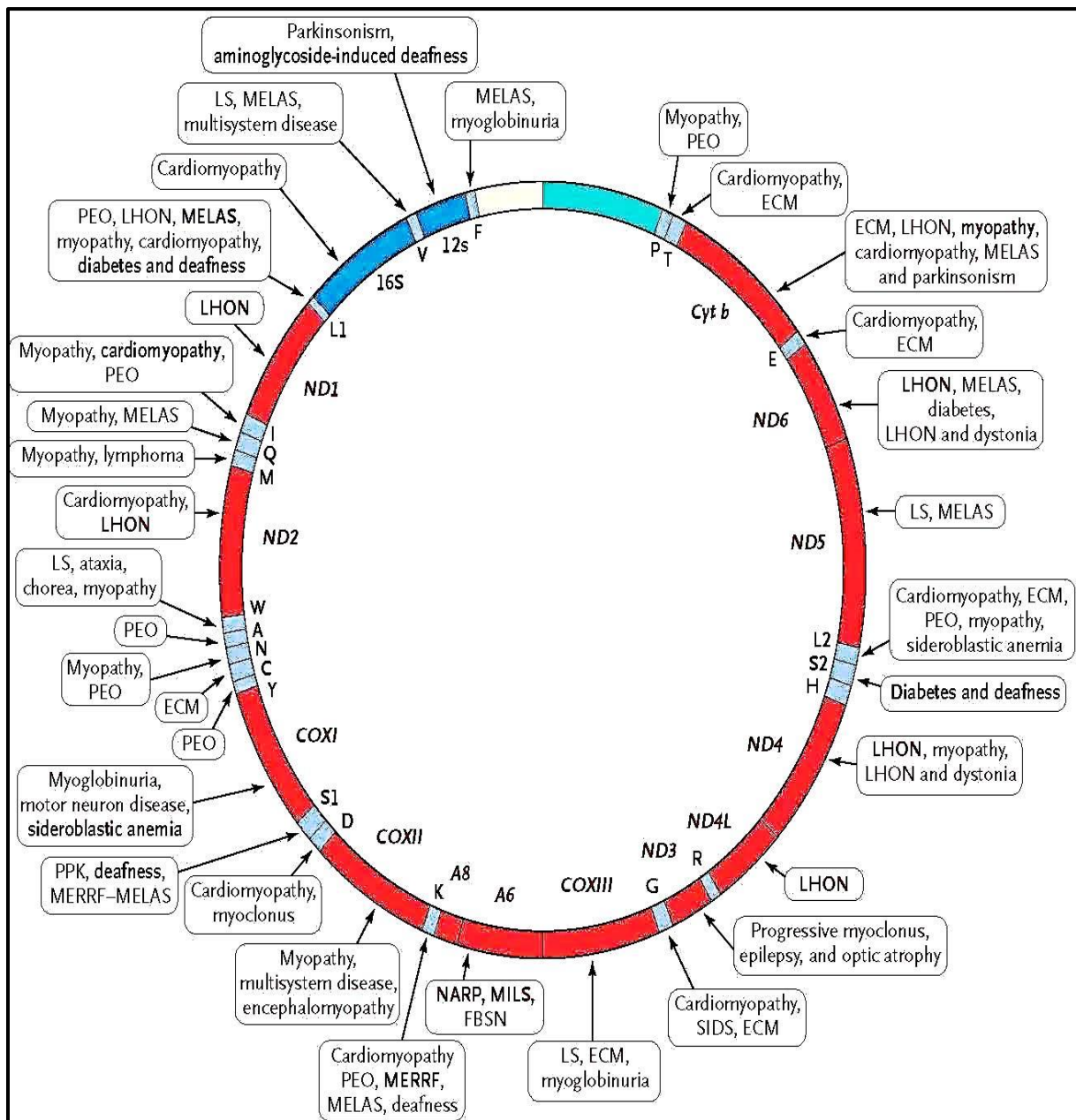


Figure 05 : Cartographie morbide de l'ADNmt (DiMauro et Schon, 2003).

Ces pathologies graves se manifestant le plus souvent dans la première enfance et sont multi-viscérales et n'espérant, à l'heure actuelle, aucun traitement. Elles portent des noms acronymiques qui reflètent la symptomatologie clinique : MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke), MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers), PEO (Progressive External Ophthalmoplegia), NARP (Neuropathie, Ataxie, Rétinite Pigmentaire), ou bien encore des syndromes de Kearns-Sayre (KS), de Pearson ou de Leigh (LS). Génétiques, elles seront à transmission maternelle (**Rötig et Munnich, 2003**).

1- Délétions de l'ADNmt :

Les délétions de grande taille de l'ADNmt (de 1,3 à 8 kb provoquant la perte d'un certain nombre de gènes ou duplications) ont été les premières mutations décrites dans les maladies mitochondriales (**Lestienne et Ponsot, 1988**). Leur prévalence est de 1,2/100000. Elles peuvent être de taille très variable et de conséquence pathologique diverse tant sur le plan biochimique que clinique. Leur localisation est également variable mais presque toujours située sur l'arc majeur entre les origines de réplication O_H et O_L . La plus fréquente est une délétion de 4,9 kb enlevant la région située entre les gènes du cytochrome b et de la sous-unité COX (Cytochrome OXYdase) II. Deux types de mécanismes aboutissent à la formation de la délétion ; le premier repose sur une erreur se produisant au cours de la réplication de type non synchronisé avec glissement de brin, le deuxième repose sur une erreur se produisant lors de la réparation des cassures doubles brin (**Krishnan et al., 2008**).

Les délétions peuvent être identiques ou différentes, celles de tailles différentes sont les conséquences de mutations nucléaires ou de dommages engendrés par les EROs dans les tissus post-mitotiques âgés, par contre la présence d'une délétion identique au sein de toutes les molécules d'ADNmt mutées d'un individu indique quant à elle qu'elle se serait produite tôt lors de l'embryogenèse (**DiMauro et Schon, 2004**). Certains patients peuvent avoir des duplications qui ne sont pas pathogènes en elles-mêmes mais qui peuvent évoluer vers des délétions pathogènes (**Krishnan et al., 2008**). Quel que soit leur type et leur origine, les délétions de l'ADNmt partagent des caractéristiques communes. Ainsi, aucune délétion de la boucle de déplacement D et des origines de réplifications O_H et O_L n'a jamais été rapportée (**Samuels et al., 2004**).

La sévérité des symptômes cliniques est due en majorité au pourcentage d'ADNmt délété dans la cellule et à sa distribution tissulaire, plutôt qu'à la taille et la localisation de la délétion dans l'ADNmt (**Chinnery et Hudson, 2000 ; Schapira, 2012**).

2- Mutations ponctuelles de l'ADNmt :

Les mutations ponctuelles pathologiques sont susceptibles d'affecter tous les gènes de l'ADNmt (ARNt, ARNr et protéines). Elles sont en général transmises par la mère et hétéroplasmiques, mais des cas d'homoplasmie ont également été rapportés, affectant généralement un tissu unique. Toutefois, ces mutations ne sont pas forcément pathologiques, et peuvent être source de polymorphismes neutres qui se transmettent le long de la lignée maternelle (**Crimi *et al.*, 2003**). Plus d'une centaine de mutations ponctuelles pathogènes de l'ADNmt ont été rapportées depuis leur première description en 1988, de nouvelles mutations sont encore régulièrement décrites de nos jours (MITOMAP ; <http://www.mitomap.org>).

Une même mutation peut être associée à différents phénotypes et un même phénotype peut être associé à différentes mutations. Cela peut s'expliquer par la distribution tissulaire de la mutation, son taux d'hétéroplasmie, ainsi que par le contexte mitochondrial et nucléaire du patient (**Wittenhagen et Kelley, 2003**).

II- Maladies liées à des mutations du génome nucléaire :

On a longtemps considéré, à tort, que les mitochondriopathies proviennent uniquement des mutations de l'ADNmt. Cela est dû au fait que pendant de longues périodes, seules les altérations du génome mitochondrial ont été identifiées. Toutefois, le nombre de maladies répertoriées dues à des mutations dans des gènes nucléaires codants pour des composantes mitochondriales est en constante augmentation. Ces pathologies sont liées à la mutation, soit d'un gène codant pour une protéine de structure de la CRM, soit d'une protéine régulant un des aspects du fonctionnement de la mitochondrie. En effet, à l'état normal, il y a une complémentarité ADNmt / ADN nucléaire (**DiMauro, 2004 ; Calvo *et al.*, 2006**).

La première maladie reconnue, due à une mutation d'un gène nucléaire codant pour une protéine mitochondriale est le syndrome de Leigh. Ce dernier est caractérisé par une encéphalomyopathie nécrosante et des crises récurrentes de régression psychomotrice. Ce syndrome est dû à la mutation du gène codant pour la sous-unité flavoprotéine du complexe II causant des dysfonctionnements au niveau de la CRM (**Bourgeron *et al.*, 1995**).

Curieusement, les mitochondriopathies d'origine nucléaire ne présentent pas toutes une atteinte multi-viscérale, alors que l'anomalie génétique est portée par toutes les cellules de l'organisme. Ces atteintes sont le plus souvent rapidement évolutives. Cependant, dans de rares cas, des patients ont vu leurs symptômes régresser, voire disparaître (**Chabrol, 2011**). Une classification exhaustive, selon le type de protéine codée est détaillée dans l'**annexe I**.

III- Polymorphisme de l'ADNmt :

Le génome mitochondrial présente un degré élevé de variabilité interindividuelle. Inégalement réparti sur son génome, les régions les plus polymorphes sont situées aux extrémités de la D-loop, et à un bien moindre degré dans la région codante.

Les différentes lignées d'ADNmt d'une population évoluent indépendamment les unes des autres par l'accumulation de mutations séquentielles. Cela permet de reconstruire les relations phylogénétiques entre les groupes de lignages partageant un ancêtre commun, caractérisés par des mutations communes : haplogroupes mitochondriaux. Ces caractéristiques évolutives ont conduit les généticiens à étudier ces polymorphismes dès 1980. Un variant, est, en général présent à l'état homoplasmique. Cette observation est toutefois paradoxale car l'ADNmt est particulièrement sujet aux mutations (**Hofman *et al.*, 1997**).

Le RFLP à haute résolution de l'ADNmt a mis en évidence plusieurs centaines de polymorphismes dans des échantillons du monde entier. Cette démarche méthodologique est devenue très célèbre en 1987, lorsque des chercheurs ont analysé des échantillons provenant d'hommes de l'ensemble de la planète (<http://www.mitomap.org/cgi-bin/tbl4gen.pl>), confirmant ainsi que la variabilité de l'ADNmt est plus élevée en Afrique par rapport au reste du monde (**Cann *et al.*, 1987**) (**annexe II**).

Cette variabilité a longtemps été considérée comme neutre et seulement utile pour la reconstruction de l'histoire des populations humaines. Dès 1988, l'étude des maladies mitochondriales et la découverte de variants sélectionnées par l'évolution ont conduit à rejeter l'hypothèse de la neutralité des variations de l'ADNmt (**DiMauro et Schon, 2003**). Des auteurs ont proposé que l'haplogroupe T par rapport à l'haplogroupe H (deux des neuf haplogroupes européens) affiche une baisse significative de l'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire (**Ruiz-Pesini *et al.*, 2000**).

Par ailleurs, l'étude de cohortes d'individus japonais centenaires montre une fréquence de l'haplogroupe asiatique D significativement plus importante que des individus plus jeunes, de sexe identique et ayant la même origine ethnique et géographique, suggérant ainsi des effets spécifiques des haplogroupes sur les phénomènes de vieillissement. Des données similaires ont été obtenues dans des populations européennes avec, en particulier, une surreprésentation des haplogroupes européens J et U (**Tanaka *et al.*, 1998**). D'autres études ont rapporté l'influence des haplogroupes mitochondriaux dans plusieurs pathologies telles que la maladie d'Alzheimer (**Chagnon *et al.*, 1999**) ainsi que la maladie de Parkinson (**Van der Walt *et al.*, 2003**).

Chapitre III

Aspects physiologiques
de la fertilité masculine

I- Appareil génital masculin :**1- Embryologie :**

Au début du développement embryonnaire, les gonades et les ébauches des organes génitaux sont indifférenciées tandis que les voies génitales sont bisexuées. Ce développement est génétiquement déterminé (**Ravel et al., 2006**). Le gène *SRY* (Sex determining Region Y), localisé sur le bras court du chromosome Y, code pour le facteur TDF (Testis Determining Factor) qui contrôle le signal qui détermine la formation du testicule et le blocage du développement embryonnaire en ovaire. La différenciation anatomique du testicule commence dès la 7^{ième} semaine de la vie intra-utérine. Le testicule dérive de trois tissus embryonnaires : l'épithélium cœlomique (qui donne les cellules de Sertoli), le mésenchyme intra-embryonnaire (qui donne les cellules de Leydig) et les cellules germinales primordiales (ou gonocytes primordiaux PGC (Primordial Germ Cell)) (**Bowles et Koopman, 2010**).

Le testicule fœtal secrète une substance non stéroïde (l'inducteur) qui stimule la différenciation et la croissance du canal de Wolff (canal méso-néphrotique) et inhibe le développement du canal de Müller (canal para méso-néphrotique). De plus, le testicule secrète des androgènes qui stimulent la fermeture de l'urètre pénien, le raphé des bourrelets scrotaux ainsi que le développement de la prostate et des vésicules séminales. L'appareil génital est achevé à la fin du premier trimestre de grossesse. La poursuite de la maturation s'effectue lentement pour s'achever au moment de la puberté. Les cellules germinales souches du testicule immature (gonocytes) restent inactives jusqu'à la puberté puis se transforment en spermatogonies souches. Par des divisions et des différenciations successives, ce réservoir de cellules souches donne naissance aux spermatozoïdes (**Catala, 2006**).

2- Anatomie :

L'appareil reproducteur masculin est constitué d'un pénis, de deux testicules (ou gonades mâles), des voies excrétrices (canaux efférents, épидидymes et canaux déférents) permettant la sécrétion des spermatozoïdes vers l'extérieur, des glandes annexes (vésicules séminales, prostate et glandes de Cowper) sécrétrices du liquide séminal qui permet de constituer avec les spermatozoïdes le sperme et du tractus uro-génital formé par l'urètre (prostatique, périnéal et pénien) qui s'ouvre à l'extérieur par le méat urinaire (**Auger et al., 2009**).

3- Histologie fonctionnelle :

3-1- Les tubes séminifères :

Les tubes séminifères sont le lieu de la production des gamètes mâles (spermatogénèse). La paroi de chaque tube est constituée par l'épithélium séminifère, où sont associées les cellules somatiques de Sertoli et les cellules de la lignée germinale, reposant sur une enveloppe périvitulaire ou *lamina propria* (Auger *et al.*, 2009).

3-1-1- L'enveloppe périvitulaire :

La *lamina propria* est composée d'une lame basale et de trois à quatre couches concentriques de cellules périvitulaires séparées par du matériel fibrillaire et collagène. Les cellules périvitulaires, contractiles, permettent la progression du contenu luminal vers les voies excrétrices (figure 6). Les altérations de cette enveloppe sont un signe d'accompagnement constant des atteintes de la spermatogénèse (Auger *et al.*, 2009).

3-1-2- Les cellules de Sertoli :

Cellules fixes qui occupent toute la hauteur de l'épithélium séminifère (70 μm) et envoient des expansions autour des cellules germinales. Les cellules de Sertoli ont un rôle important pour la bonne marche de la spermatogénèse. Par les jonctions étanches qu'elles établissent entre elles vers leur pôle basal, elles constituent une barrière physique séparant un compartiment basal en rapport avec l'interstitium et un compartiment apical ; elles forment ainsi la barrière hémato-testiculaire (figure 6) (Setchell, 2008).

Les cellules de Sertoli permettent aux cellules germinales de migrer au fur et à mesure de leur maturation, en direction de la lumière du tube séminifère. Elles exercent des fonctions trophiques et assurent paracrines à l'égard des cellules germinales, elles sont responsables de la production du plasma séminal primitif (Mruk et Cheng, 2005 ; Petersen et Soder, 2006).

3-2- L'espace interstitiel :

L'espace interstitiel est un compartiment constitué par les cellules de Leydig situées dans le tissu conjonctif lâche entre les espaces inter-tubulaires (figure 6). Ces cellules sont douées d'une fonction endocrine qui consiste en la production des hormones stéroïdes issues d'un précurseur commun, le cholestérol dont la transformation par différentes enzymes aboutit à la formation des trois androgènes testiculaires principaux : la testostérone, la Di-Hydro-Testostérone (DHT) et le 17- β -œstradiol (Ruwanpura *et al.*, 2010).

La testostérone est le principal androgène circulant dont la sécrétion globale est de 5 à 7,5 mg/24h chez l'homme adulte normal (la synthèse de 95 % de la testostérone plasmatique est assurée par les cellules de Leydig), la DHT est l'androgène actif au niveau des tissus périphériques (prostate, épидидyme et vésicules séminales) grâce à la présence de l'enzyme 5- α réductase dans ces tissus. Le 17- β -œstradiol est sécrété par le testicule mais ne représente que 20 % du 17- β -œstradiol circulant (le reste provenant de la conversion périphérique de la testostérone) (Bourcigaux *et al.*, 2008).

Sur le plan physiologique, les androgènes ont pour principales fonctions la différenciation sexuelle masculine, le développement des organes génitaux internes et externes, le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires. En association avec l'hormone folliculo-stimulante (FSH), la testostérone est essentielle pour l'initiation et le maintien de la spermatogenèse. Elle agit sur les cellules de Sertoli, et sur les cellules péri-tubulaires, via des récepteurs spécifiques, stimulant indirectement la spermiogénèse par voie paracrine. Les cellules de Leydig produisent aussi de nombreux peptides et facteurs de croissance qui participent à la régulation paracrine des fonctions testiculaires (Idelman et Verdeti, 2000).

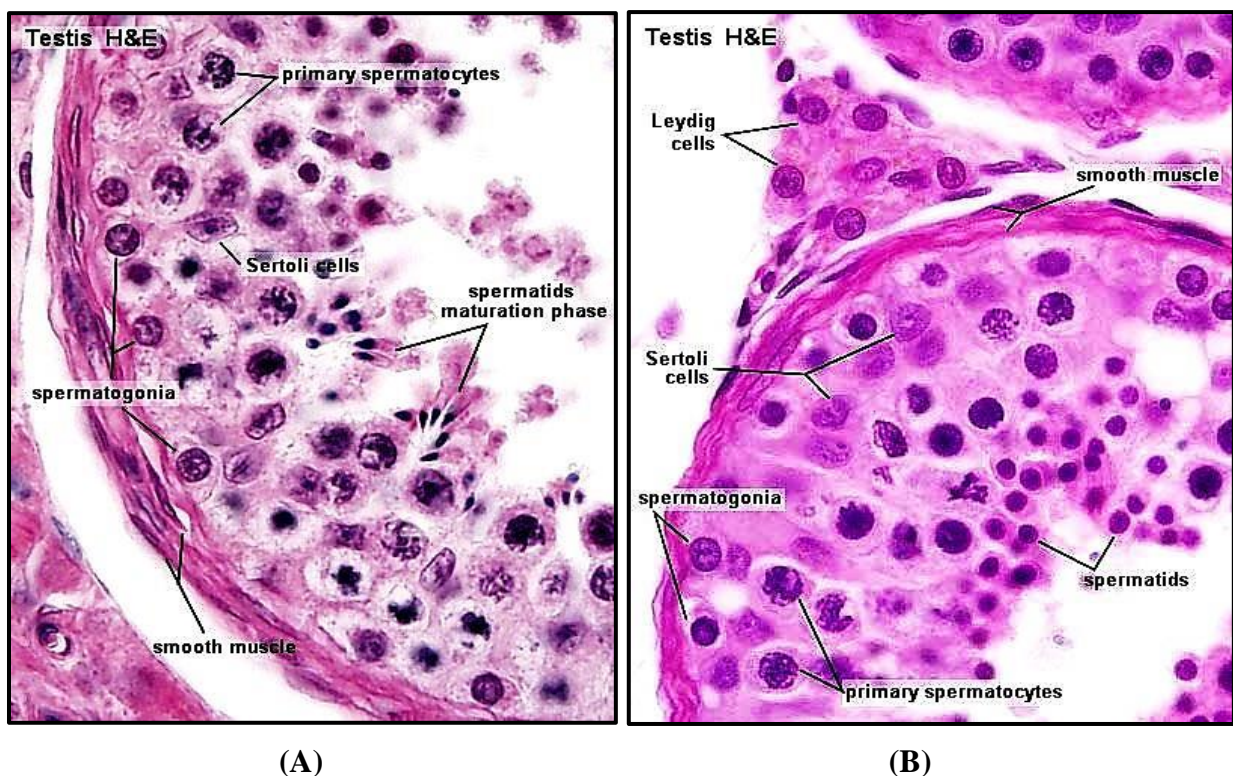


Figure 06 : Localisation du processus de la spermatogenèse chez l'homme (Hill, 2015).

(A) et (B) Coupes histologiques transversales du testicule humain adulte au niveau d'un tubule séminifère (coloration à l'Hémaroxyline-Éosine (HE), grossissement x40).

II- Spermatogénèse et spermatozoïdes :

1- Les différentes étapes de la spermatogénèse :

La spermatogénèse est un processus complexe et continu de multiplication, de différenciation cellulaire et d'apoptose, qui, à partir des cellules souches germinales diploïdes, les spermatogonies, aboutit à la formation des spermatozoïdes, cellules haploïdes hautement spécialisées, et à leur libération dans la lumière des tubules séminifères. Les spermatozoïdes vont ensuite acquérir leur mobilité et finiront leur maturation durant leur transit dans les voies génitales mâles. Chaque jour, l'homme produit, en moyenne 200 millions de spermatozoïdes. La spermatogénèse est un processus cyclique (74 jours environ) qui se décompose en trois phases séquentielles :

- La prolifération et la différenciation des spermatogonies permettent le renouvellement des cellules progénitrices (spermatogonies- A_{dark} et $-A_{\text{pale}}$). La division des spermatogonies- A_{pale} , à vocation multiplicative, aboutira à la constitution des spermatogonies B, lesquelles se diviseront à leur tour pour donner les spermatocytes au stade pré-leptotène.
- La méiose comprend les dernières synthèses d'ADN du stade spermatocyte pré-leptotène jusqu'à la fin des deux divisions méiotiques. Les spermatocytes I se transforment par la suite en spermatocytes II puis en spermatides rondes haploïdes.
- La spermiogénèse qui est la cyto-différenciation des spermatides rondes en spermatides allongées. Elle correspond à la réorganisation du noyau, le développement et la mise en place de l'acrosome, la formation du flagelle et le remaniement du cytoplasme. La spermiogénèse se déroule au niveau de l'épithélium séminifère dans des logettes formées par les cellules de Sertoli (**figure 7**) (Wheater *et al.*, 2004 ; Hermo *et al.*, 2010).

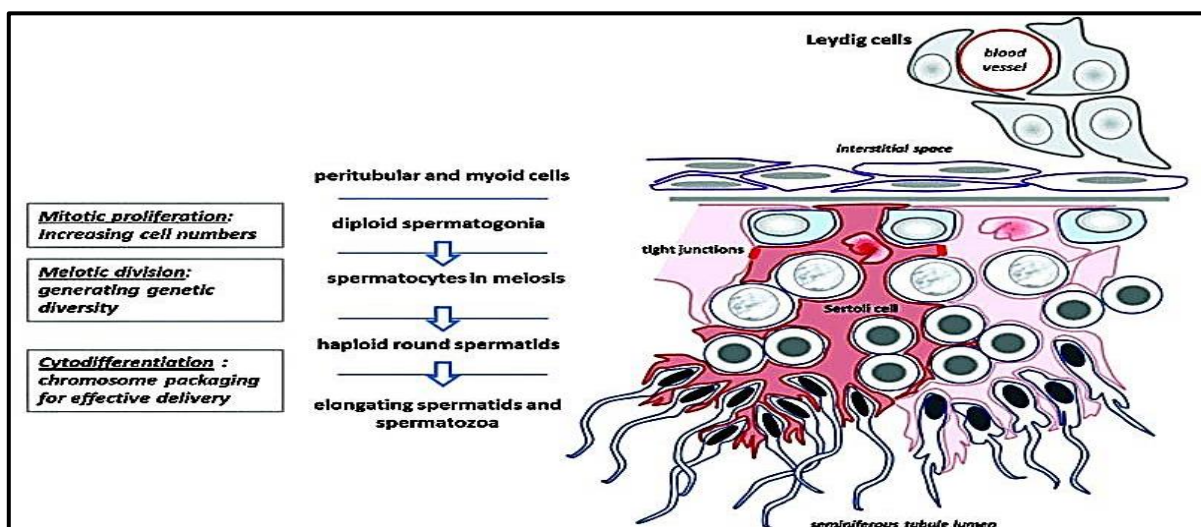


Figure 07 : Représentation schématique des étapes de la spermatogénèse (Hill, 2015).

Au terme de la spermatogenèse, les spermatozoïdes se séparent des cellules de Sertoli et sont libérés dans la lumière du tubule séminifère. Cette étape est appelée la spermiation. Les spermatozoïdes vont poursuivre leur excrétion vers l'épididyme (**Hermo et al., 2010**).

2- La structure des spermatozoïdes :

Les spermatozoïdes sont les plus divergents de tous les types de cellules, probablement parce qu'ils réalisent leur mission en dehors du corps, où ils sont exposés à plusieurs barrières physiques et chimiques, pour surmonter ces obstacles les spermatozoïdes doivent évoluer morphologiquement et fonctionnellement (**Sharma et Agarwal, 2011**).

2-1- La tête :

La tête du spermatozoïde est principalement composée du noyau et de l'acrosome. Le noyau occupe la majeure partie du volume de la tête. L'ADN haploïde du gamète mâle est ultra-condensé à l'intérieur du noyau grâce aux protamines, équivalents des histones dans les cellules somatiques. Néanmoins, cette structure comporte un certain nombre de zones où la chromatine est beaucoup plus dispersée appelées vacuoles nucléaires (**Oko et Sutovsky, 2009**).

L'acrosome est une vésicule dotée d'une fonction exocytique qui se trouve dans la partie antérieure de la tête, plaquée entre le noyau et la membrane plasmique (couvre les 2/3 antérieurs du noyau des spermatozoïdes matures). L'acrosome contient une grande diversité d'enzymes actives telles que la hyaluronidase, des protéases : l'acrosine, la phosphatase acide, des phospholipases A2 et l'aryl-sulphatase (**Moreno et Alvarado, 2006**). Au cours de la fécondation, ces enzymes permettent une meilleure pénétration des spermatozoïdes à travers les cellules de la *corona radiata* et déstabilisent la zone pellucide, couche protéique protectrice entourant l'ovocyte (**Sharma et Agarwal, 2011**).

2-2- Le flagelle :

Le flagelle est divisé en trois parties principales : la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. La tête est reliée au flagelle par la pièce de connexion. De ce point, le complexe central de microtubules formant l'axonème s'étend sur toute la longueur du flagelle. Les mitochondries allongées des spermatozoïdes sont situées uniquement dans la pièce intermédiaire. Seul l'axonème entouré de la membrane plasmique forme la pièce terminale (**Inaba, 2007**).

3- Régulation de la spermatogenèse :

La spermatogenèse normale résulte d'un équilibre entre les processus de prolifération, de différenciation et d'apoptose des cellules germinales. Cette régulation s'exerce à deux niveaux : endocrine (hormonale) et paracrine (via des facteurs locaux) (**Auger *et al.*, 2009**). L'apoptose intervient durant la spermatogenèse normale en éliminant les cellules germinales porteuses d'anomalies génétiques impropres à la réalisation d'une fécondation normale ou à la conception d'une descendance saine ; toute dérégulation peut conduire à une infertilité (**Shaha, 2007**). L'apoptose des cellules germinales se déroule en impliquant deux processus, l'un intrinsèque dans les mitochondries, l'autre extrinsèque par des récepteurs membranaires (superfamille du récepteur au TNF (Tumor Necrosis Factor)) (**Grunewald *et al.*, 2009**).

En remarque, la mise en évidence de mécanismes du processus apoptotique sur les spermatozoïdes éjaculés fait débat. Il pourrait pourtant s'agir alors d'une mort programmée du spermatozoïde en l'absence de fécondation intriquant étroitement deux mécanismes, celui de l'apoptose et celui de la capacitation spermatique (**Shaha, 2007 ; Grunewald *et al.*, 2009**).

4- Spermatozoïdes et mitochondries :

Lors de la spermatogenèse, les mitochondries des spermatogonies, des spermatocytes jusqu'au stade leptotène et des cellules testiculaires de support sont typiques de celles des cellules somatiques. Avec le début de la méiose, les mitochondries commencent à se différencier : élongation, dilatation de l'espace inter-membranaire conduisant à la condensation de la matrice mitochondriale et à la disparition des crêtes. Parallèlement, elles acquièrent ou perdent différents marqueurs protéiques à partir du stade pachytène notamment, suggérant la spécificité de ces mitochondries. Durant la méiose, les mitochondries sont regroupées autour du noyau. Au cours de la spermiogénèse, la pièce intermédiaire est créée par migration caudale de l'annulus et migration des mitochondries le long de l'axonème. Le manchon mitochondrial ainsi formé est organisé en hélice qui comprend 11 à 13 tours avec deux mitochondries par tour (**Cummins, 1998**). Les mitochondries allongées des spermatozoïdes sont situées uniquement dans la pièce intermédiaire. Le feuillet mitochondrial entoure l'axonème au niveau de la pièce intermédiaire, forme une hélice enroulée de façon très serrée autour des fibres denses externes et s'arrête au disque terminal qui possède des caractéristiques spécifiques aux spermatozoïdes. La structure de la capsule mitochondriale stabilise les feuillets internes et externes, ce qui produit un espace inter-membranaire de dimension supérieur à celui observé dans les cellules somatiques (**Kim *et al.*, 2007**).

Chapitre IV

Aspects étio-pathologiques
de l'infertilité masculine

La reproduction humaine est une fonction physiologique qui comprend de nombreuses étapes : formation des gamètes, fécondation, développement pré-implantatoire, l'implantation et développement post-implantatoire. Ainsi, l'aptitude à procréer dépend du bon fonctionnement coordonné des systèmes reproducteurs mâle et femelle (**Auger *et al.*, 2009**).

Dans l'espèce humaine, la fécondité ou probabilité mensuelle d'obtenir une grossesse est d'environ 25 %. La fertilité est la capacité de produire une descendance, alors que la fécondité est la capacité biologique à se reproduire sur la base de la probabilité mensuelle de conception, on parle d'infertilité quand cette fonction est perturbée. Dans le cas d'une incapacité totale à procréer naturellement on parle de stérilité ; ce terme est réservé à l'incapacité totale et définitive de concevoir à cause d'une étiologie évidente et non curable. Pour une probabilité de procréer inférieure à 5 % on parle d'hypofertilité (**Schill *et al.*, 2008**). Selon l'OMS, l'infertilité est définie par l'absence de grossesse après au moins 12 mois de rapports sexuels non protégés. Ces rapports sexuels doivent être normaux en fréquence et en qualité à l'intérieur d'un couple vivant régulièrement ensemble. On distingue l'infertilité primaire quand il n'y a jamais eu de grossesse et l'infertilité secondaire s'il y a eu une ou plusieurs menées à terme. Dans environ un tiers des cas, l'infertilité est d'origine masculine et est, presque toujours, marquée par un spermogramme anormal (**Brzakowski *et al.*, 2009**).

I- Diagnostic clinique et biologique :

La détermination de la cause d'une infertilité chez un homme revêt un intérêt diagnostique et thérapeutique. Un diagnostic correct, outre d'offrir la possibilité pour l'homme infertile de connaître les causes de son infertilité, diminue la prescription d'exams complémentaires inutiles. Un diagnostic exact permet le choix d'une thérapeutique adéquate (insémination intra-utérine, Fécondation *In Vitro* (FIV) avec ou sans ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection), pertinence d'une biopsie testiculaire ou un recours à l'adoption).

La prise en charge d'une infertilité masculine commence par une consultation chez un andrologue (interrogatoire et examen clinique approprié) suivi par la réalisation d'un spermogramme et éventuellement d'une échographie uro-génital, d'une spermoculture et d'un bilan hormonal (**Schill *et al.*, 2008**).

1- Diagnostic clinique :**1-1- Interrogatoire :**

Il est établi pour rechercher, au niveau familial, des antécédents d'infertilité, de cancers de l'appareil uro-génital et de maladies génétiques. Sur le plan personnel, pour rechercher des antécédents de chirurgie inguino-scrotale (cryptorchidie, hernie inguinale), de pathologies chroniques (diabète, affections respiratoires, neurologiques, psychiatriques, etc ...) et de prise médicamenteuse. Il est intéressant de rechercher tout évènement susceptible de perturber les fonctions testiculaires (âge, déroulement de la puberté, traumatisme ou torsions testiculaire, antécédents d'infections uro-génitales). Les habitudes toxiques doivent être prospectées (tabagisme, prises régulières de cannabis et d'alcool) ainsi que la profession (exposition excessive des testicules à la chaleur, aux pesticides, aux solvants, etc ...). Enfin, il faudra s'intéresser au déroulement et à la fréquence des rapports sexuels en recherchant des dysfonctions sexuelles masculines pouvant compromettre la fertilité du couple (dysfonction érectile, anéjaculation, dyspareunie, éjaculation précoce, etc ...) (**Huyghe et al., 2008 ; Marcelli et al., 2009**).

1-2- Examen clinique :

L'examen clinique recherche, en premier, des signes d'hypoandrisme (gynécomastie, diminution de la pilosité, baisse de la libido et répartition gynoïde des graisses) évoquant une atteinte de la fonction endocrine testiculaire. Le reste de l'examen est centré sur l'appareil uro-génital : palpation testiculaire (évaluation du volume, de la consistance et la recherche de nodules), palpation des épидидymes (recherche d'une dilatation évoquant un obstacle, la présence ou non des canaux déférents au niveau du cordon), recherche d'une dilatation veineuse (varicocèle) au niveau du cordon et du pôle supérieur du testicule gauche, évaluation de la taille de la verge et la position du méat urétral (hypospadias), toucher rectal pour examiner la prostate et les vésicules séminales (**Huyghe et al., 2008 ; Marcelli et al., 2009**).

1-3- Échographie de l'appareil uro-génital :

Cet examen précise le volume de chaque testicule, dépiste des anomalies passées inaperçues à l'examen clinique (tumeurs testiculaires infra-cliniques). L'étude du carrefour vésiculo-déférentiel n'est pas systématique mais est importante pour l'évaluation des atteintes obstructives (**Poncelet et Sifer, 2011**).

2- Diagnostic biologique :**2-1- Spermogramme (spermocytogramme) :**

L'examen des paramètres spermatiques constitue l'élément de base du bilan chez un homme infertile. Il comprend classiquement le spermogramme et le spermocytogramme mais il doit être complété par un test de migration-survie, une spermoculture, et un test de Hühner avant mise en route d'une éventuelle Procréation Médicalement Assistée (PMA) (Schill *et al.*, 2008 ; Auger *et al.*, 2009). Les normes d'interprétation de cet examen sont mentionnées dans l'**annexe III**.

En cas d'anomalies constatées, compte tenu des grandes fluctuations physiologiques des paramètres spermatiques et de la durée d'un cycle de spermatogenèse, il faudra le reconstrôler au moins une fois, environ trois mois après le précédent. Cela permettra de savoir si les anomalies constatées initialement se confirment ou si elles étaient transitoires (Schill *et al.*, 2008 ; Auger *et al.*, 2009).

2-2- Spermoculture :

Il s'agit d'un examen bactériologique demandé en cas d'antécédents infectieux génito-urinaires ou de symptomatologie évocatrice et devant des anomalies du spermogramme. Elle est considérée comme pathologique s'il est retrouvé plus de 105 Unités Formant des Colonies (UFC) d'un ou plusieurs agents pathogènes bactériens. Elle doit tenir compte du nombre et du type des germes retrouvés et d'éventuelles anomalies associées du spermogramme (leucospermie, asthénozoospermie, tératozoospermie). Une spermoculture négative ne garantit pas l'absence d'infection surtout en présence d'une leucospermie (Schill *et al.*, 2008 ; Auger *et al.*, 2009).

2-3- Bilan hormonal :

Un bilan hormonal est prescrit d'emblée devant la constatation d'une hypotrophie testiculaire à l'examen clinique, de signes d'hypoandrisme et en cas d'anomalies importantes du spermogramme. Il consiste à doser la FSH, éventuellement l'inhibine B, pour évaluer la fonction exocrine testiculaire et la testostérone totale pour évaluer la fonction endocrine. En cas de baisse de la testostérone, un dosage de la LH (Luteinizing Hormone) et de la prolactine sera demandé (Bhasin *et al.*, 2007).

II- Classification :

Les infertilités masculines peuvent être classées en deux formes : obstructives (excrétoires) dans 30 à 40 % des cas et non obstructives (sécrétoires) dans 60 à 70 % des cas (Schill *et al.*, 2008).

1- Infertilités obstructives (excrétoires) :

La production des spermatozoïdes testiculaires est conservée (normale ou sub-normale) mais il existe une anomalie d'excrétion des spermatozoïdes due à un obstacle sur le tractus génital. Selon l'étiologie, elles sont classées en deux groupes :

1-1- L'infertilité obstructive congénitale : les canaux déférents et/ou vésicules séminales sont absents. Cette Agénésie Bilatérale des Canaux Déférents (ABCD) est due à une anomalie congénitale, à un défaut de développement des dérivés Wolffiens, ou à une atrésie secondaire de tout ou d'une partie des canaux déférents et/ou des vésicules séminales.

1-2- L'infertilité obstructive acquise : des lésions peuvent entraîner des obstructions au niveau de l'épididyme et/ou des canaux déférents (tumeurs testiculaires, séquelles interventionnelles ou inflammatoires, kystes prostatiques volumineux comprimant les canaux éjaculateurs) ou être à l'origine de troubles de l'éjaculation (paraplégie, troubles sexuels, éjaculation rétrograde) (Schill *et al.*, 2008).

2- Infertilités non obstructives (sécrétoires) :

Elles se traduisent par des oligozoospermies plus ou moins sévères ou des azoospermies et sont dues à une atteinte de la spermatogénèse. Elles correspondent à une anomalie de production des spermatozoïdes par les testicules. Différentes causes peuvent être incriminées :

2-1- L'infertilité non obstructive centrale : elle constitue 1 à 5 % des cas d'infertilités masculines. Il s'agit d'un déficit de stimulation des testicules par les gonadotrophines (FSH et LH) entraînant un hypoandrisme plus ou moins marqué et une hypotestostéronémie, liée à une anomalie constitutionnelle (syndrome de Kallmann-de Morsier) ou acquise (tumeurs hypothalamiques hypophysaires, radiothérapie, atteinte post-chirurgicale de la région sellaire, maladies infiltratives, anorexie mentale) (Bourcigaux *et al.*, 2008).

2-2- L'infertilité non obstructive testiculaire : elle constitue 52 % des cas d'infertilité masculine. Il s'agit d'une atteinte fonctionnelle du testicule, liée à une anomalie :

- **Congénitale :** anomalies génétiques (syndrome de Klinefelter, microdélétions du chromosome Y ou mutations au niveau du récepteur de l'hormone FSH).
- **Acquise :** varicocèle, cryptorchidie, altération ischémique (séquelle de traumatisme inguino-scrotaux ou de torsion testiculaire), antécédent d'orchite ourlienne, exposition à certaines substances toxiques, l'exposition à la chaleur.
- **Idiopathique :** où les causes de l'infertilité non obstructive testiculaire restent inexplicées. À ce jour, l'étiologie de l'infertilité masculine demeure inconnue dans 65 à 75 % des cas (**Krausz, 2011**).

III- Étiologie :

1- Les causes endocriniennes :

L'atteinte de l'axe hypothalamo-hypophysaire congénitale génétique, anatomique tumorale, traumatique, ischémique (drépanocytose) ou toxique (dépôts ferriques de la β -thalassémie, drépanocytose ou hémochromatose) est responsable d'un hypogonadisme hypogonadotrophique, associant le plus souvent un défaut ou un retard du développement pubertaire avec des testicules de petites tailles et une spermatogenèse réduite ou absente.

Cet axe régulateur est particulièrement sensible à l'effet des œstrogènes (d'origine tumorale ou taux élevés en cas d'hyperthyroïdie, d'obésité et d'éthylisme chronique), des androgènes (origine tumorale, hyperplasie congénitale des surrénales, hypothyroïdie) et de la prolactine (origine tumorale ou hypothyroïdie primaire avec élévation du taux de l'hormone thyroïdienne) (**Lecomte et Gervaise, 2001**).

2- Les maladies infectieuses :

Certaines maladies infectieuses (virales, bactériennes ou parasitaires), lorsqu'elles s'accompagnent d'une inflammation des organes génitaux, en particulier en période pubertaire, peuvent être responsables d'atteintes plus ou moins importantes de la spermatogenèse (**Pellati et al., 2008**).

Il est à noter enfin qu'une infection latente, peut expliquer un grand nombre d'auto-immunisation (**Rusz et al., 2012**).

3- Les problèmes immunitaires :

Les spermatozoïdes peuvent provoquer, dans certaines circonstances, la production d'anticorps. Cette auto-immunisation peut être déclenchée par l'obstruction unilatérale ou bilatérale des voies spermatiques, des processus traumatiques (vasectomie) ou infectieux (épididymite) des organes génitaux. Il en résulte un défaut de mobilité (capacité réduite de pénétrer dans le mucus cervical) ou des agglutinations (spermatozoïdes liés entre eux par la tête ou la queue, incapables de féconder) (Schill *et al.*, 2008).

4- Les causes environnementales :

Il existe depuis longtemps un débat concernant l'influence des facteurs environnementaux sur la fertilité masculine. Dès 1992 (Carlsen *et al.*, 1992), de nombreux chercheurs et cliniciens ont affirmé que le progrès de la société et la détérioration de l'environnement sont probablement impliqués dans la diminution de la fertilité masculine. À ce jour, les facteurs de risques proposés sont liés au mode de vie : tabagisme, alcool, drogues, exposition régulière à la chaleur, aux radiations ou à des molécules toxiques, pollution de l'air, alimentation, stress et perturbateurs endocriniens (Miyamoto *et al.*, 2012).

4-1- Les effets de la chaleur :

La température des testicules chez l'homme adulte est comprise entre 30° et 35,5° C, étant ainsi, en moyenne, inférieure de 4,5° C à la température corporelle centrale. Cette différence de température est retrouvée chez la plupart des mammifères. Ce gradient thermique est assuré par deux systèmes thermorégulateurs (Setchell et Mieusset, 1996). Plusieurs études ont montré qu'une augmentation de 1,8 à 5,2 °C de la température des testicules a des effets négatifs sur la spermatogenèse, la ralentit, voire la bloque. Il en résulte des azoospermies réversibles pour lesquelles plusieurs mois sont parfois nécessaires à la régénération des spermatozoïdes (Jung et Schuppe, 2007).

4-2- La pollution industrielle :

Il est prouvé que de nombreux pesticides utilisés massivement pour l'agriculture ont des effets délétères sur la spermatogenèse et sont à l'origine d'hypofertilité (Meeker *et al.*, 2008). Quelques métaux lourds tels que le plomb, le cadmium, le mercure et le lithium constituent un groupe d'éléments chimiques toxiques et polluants qui ont eux aussi des conséquences néfastes sur la spermatogenèse (Bonde *et al.*, 2002).

Les hydrocarbures hydrogénés, utilisés dans l'industrie du pétrole, des plastiques, des solvants et des antigels génèrent des azoospermies le plus souvent irréversibles (**Rubes *et al.*, 2005 ; Sokol *et al.*, 2006**).

4-3- Les effets des ondes et radiations ionisantes :

L'irradiation accidentelle des organes génitaux peut entraîner une azoospermie temporaire si la dose est comprise entre 2 et 6 Gray. Cette azoospermie devient irréversible si la dose est supérieure à 8 Gray et peut même entraîner des aberrations chromosomiques. Ainsi, la radiothérapie a elle aussi des effets très délétères sur la spermatogenèse et donc sur la fertilité (**Berthaut *et al.*, 2008 ; Jeruss et Woodruff, 2009**).

D'autres types de rayonnements tels que ceux générés par les téléphones mobiles et les ultrasons seraient également susceptibles d'influer sur la qualité des spermatozoïdes mais les données disponibles restent peu claires (**Derias *et al.*, 2006**).

4-4- Effets de l'alimentation :

Un bon déroulement de la spermatogenèse humaine nécessite un apport quantitatif et qualitatif convenable en protéines (notamment certains acides aminés dont l'arginine), en acides gras et en vitamines A, C et E (**Comhaire, 2010**).

La consommation de substances mimant les stéroïdes est mise en cause dans de nombreuses oligozoospermies. Ainsi, de nombreux aliments consommés quotidiennement, parmi lesquels figurent les épinards, le chou et le soja contiennent des phyto-stéroïdes à l'origine d'une baisse du nombre de spermatozoïdes (**Sermondade *et al.*, 2011**).

4-5- Consommation d'alcool, tabac et substances illicites :

La consommation du tabac influe énormément sur la fertilité, certains composants du tabac (nicotine, cotinine, cadmiums...) ont été retrouvés dans le plasma séminal des fumeurs le transformant ainsi en un environnement toxique pour les spermatozoïdes. La mobilité des spermatozoïdes se trouvera altérée (**Kunzle *et al.*, 2003 ; Ragheb et Sabanegh, 2009**).

La consommation exagérée d'alcool a des effets néfastes sur la spermatogenèse car il inhibe la synthèse de testostérone (**Ren *et al.*, 2005**). La consommation de plusieurs drogues telles que le cannabis, l'héroïne ou encore la cocaïne peut être à l'origine d'asthénozoospermie voire de tératozoospermie (**Poncelet et Sifer, 2011**).

4-6- Autres causes :

- **La varicocèle :** se définit par la dilatation des veines du cordon spermatique, et du scrotum. Sa fréquence est de 5 à 10 % dans la population générale, 30 à 40 % des hommes consultant pour infertilité. La varicocèle est caractérisée par un spermogramme particulier, évocateur de l'atteinte : une asthénozoospermie prédominante sur une oligozoospermie modérée et surtout une tératozoospermie avec des formes immatures, des formes allongées et effilées dont la proportion pourrait se situer aux environs de 20 % (**Argawal et al., 2007**).
- **L'âge :** on note une diminution progressive de l'efficacité de la spermatogenèse avec l'âge tant sur la quantité que sur la qualité après 45 ans (**Brzakowskia et al., 2009**).
- **Les troubles du coït :** représentent environ 5 % des causes d'infertilité. Ces troubles peuvent être dus à l'impuissance, l'éjaculation précoce, l'anéjaculation ainsi que l'éjaculation rétrograde (présence de spermatozoïdes dans l'urine après une éjaculation) (**Fode et al., 2012**).
- **Les causes traumatiques et chirurgicales :** peuvent être incriminées dans diverses circonstances telles que : la torsion du cordon spermatique (entraînant une nécrose ischémique testiculaire), le traumatisme du testicule, l'oblitération accidentelle des canaux éjaculateurs lors des opérations d'hernie inguinale ou d'hydrocèle, vasectomie dans le cas de stérilisation volontaire (**Lopez-Teijon et al., 2008 ; Schill et al., 2008**).
- **Les causes médicamenteuses :** plusieurs médicaments peuvent être à l'origine d'une infertilité : les bêtabloquants, les inhibiteurs calciques, les médicaments de chimiothérapie, les immunosuppresseurs, les antimétabolites, les stéroïdes anabolisants, les antibiotiques (sulfamides, gentamicine), les neuroleptiques, les anti-goutteux, les corticoïdes, les antiulcéreux ainsi que certains anti-inflammatoires (salazosulfapyridine) (**Lopez-Teijon et al., 2008 ; Schill et al., 2008**).
- **Pathologies :** le diabète de type II peut s'accompagner d'oligo-asthénozoospermie au cours de son traitement aux biguanides ; le diabète aussi à lui-seul peut avoir un effet négatif sur la fertilité masculine surtout au niveau moléculaire car il peut endommager l'ADN des spermatozoïdes (**Lopez-Teijon et al., 2008 ; Schill et al., 2008**).

Chapitre V
Génétique
de l'infertilité masculine

Les infertilités masculines idiopathiques comprennent toutes celles pour lesquelles une origine génétique peut être suspectée. Elles restent souvent inexplicables en raison du très grand nombre de gènes impliqués dans la spermatogenèse. En dehors des rares cas où le phénotype suggère un défaut génétique particulier, le bilan génétique de l'homme infertile se résume à la recherche des causes les plus fréquentes, à savoir les anomalies chromosomiques, plus particulièrement celles du chromosome Y.

I- Le chromosome Y :

1- Cartographie structurale :

Le chromosome Y humain est un petit chromosome d'environ 60 Mb qui ne représente que 2 à 3 % du génome. Il est constitué d'une grande portion d'hétérochromatine et ne comporte que peu de gènes. Pendant de nombreuses années, il a été considéré comme un « désert génétique ». Il est maintenant admis qu'il a dégénéré au cours de l'évolution, en même temps qu'il s'est progressivement spécialisé dans la différenciation masculine et le contrôle de la spermatogenèse (Graves *et al.*, 2006). Il est constitué de deux régions de tailles inégales :

- Les régions pseudo-autosomiques PAR1 et PAR2 communes au chromosome X, respectivement de 2,6 et 0,32 Mb, et qui permettent une recombinaison interchromosomique avec le chromosome X et sont situées aux extrémités distales du chromosome.
- La région spécifique du chromosome Y ou MSY (Male Specific Y chromosome), ne recombine jamais avec le chromosome X et constitue près de 95 % de la longueur du Y. Elle regroupe le bras court, la partie la plus centromérique du bras long d'environ 23 Mb (dont 8 Mb sur le bras court et près de 15 Mb sur le bras long) ainsi qu'une grande région hétérochromatique non fonctionnelle et polymorphe localisée dans la partie distale du bras long (Yq12) constituée essentiellement par deux séquences hautement répétées (DYZ1 et DYZ2). MSY renferme des gènes impliqués dans le déterminisme du sexe (*SRY*) et la spermatogenèse (*AZF* (AZoospermia Factor)) (Skaletsky *et al.*, 2003 ; Bachtrog, 2013). La partie fonctionnelle de la région MSY est constituée de trois segments selon la nature des gènes qui les constituent : une région appelée X-transposée de 3,4 Mb, présentant 99 % d'homologie avec la région Xq21.2, pauvre en gènes et riche en séquences répétées, des régions contenant des gènes X-dégénérés (8,5 Mb) présentes sur le bras court et le bras long du chromosome Y ainsi que des régions dites ampliconiques (10,2 Mb) comportant des gènes en multiples copies (figure 8).

Plusieurs de ces gènes localisés sur le chromosome Y ont été proposés pour le contrôle de la spermatogenèse mais leur implication formelle n'a pu être apportée (Ravel *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2008 ; Ravel et Siffroi, 2009).

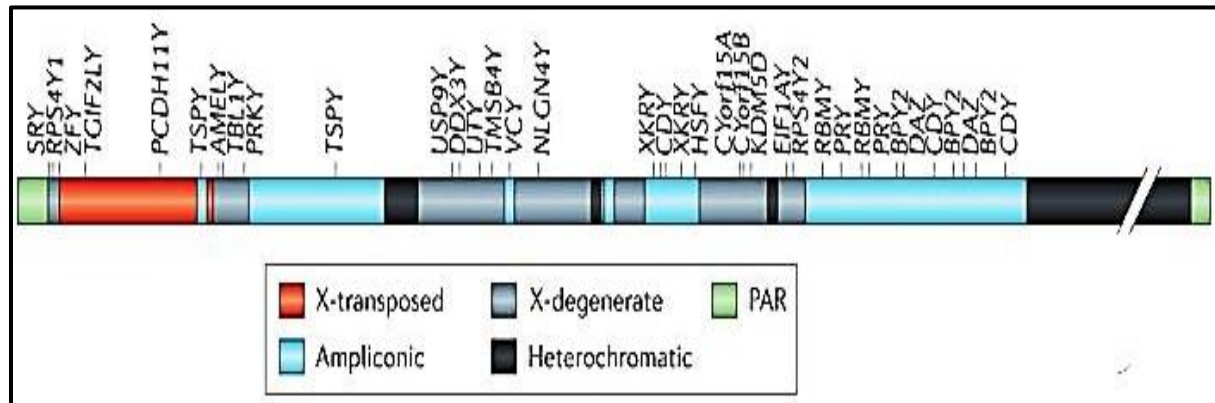


Figure 08 : Cartographie du chromosome Y humain (Bachtrog, 2013).

2- Cartographie génique :

Au sein de la région MSY, en p11.3, se trouve le gène *SRY* découvert en 1990, qui code pour le facteur TDF dont l'expression est responsable de la différenciation testiculaire (Zenteno *et al.*, 1997). MSY renferme également une région impliquée dans la spermatogenèse, nommée AZF, mise en évidence en 1976, localisée en Yq11.23 (Tiepolo et Zuffardi, 1976).

On dénombre aujourd'hui dans la région MSY 156 unités transcriptionnelles (dont 78 qui sont non codantes) qui codent pour 27 protéines différentes (Faure, 2007). Parmi les gènes codants, 12 sont d'expression ubiquitaire (gènes de ménage ou "housekeeping") et 11 sont exprimés spécifiquement (ou majoritairement) dans le testicule :

- Les gènes de ménage, présents en copie unique sur le chromosome Y, localisés au sein des séquences X-dégénérées 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 : *USP9Y* (**Ubiquitin-Specific Protease 9 Y chromosome**) (anciennement appelé *DFFRY* pour *Drosophila Fat-Facets Related Y*), *DDX3Y* (**Dead-box protein 3 Y chromosomal**) (anciennement appelé *DBY* pour *Dead Box Y*), *UTY* (**Ubiquitous Tetratricopeptide repeat motif Y**), *SMCY* (**Selected Mouse cDNA on the Y**) et *eIF1AY* (**eukaryotic translation-Initiation Factor 1A Y isoform**) (figure 8).

- Les gènes exprimés spécifiquement au niveau testiculaire, principalement localisés dans les séquences ampliconiques, et qui sont 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) et **CDY** (Chromo-Domain Y) (figure 8) (Cram *et al.*, 2006 ; Faure, 2007).

II- Anomalies génétiques et infertilité masculine :

Les facteurs génétiques de l'infertilité masculine peuvent être chromosomiques : autosomiques ou gonosomiques, ou géniques, à effets pléiotropes ou limités à la lignée germinale. Ces anomalies peuvent survenir *de novo*, ou peuvent être familiales (Coutton *et al.*, 2012).

La composante génétique de l'infertilité masculine a été évoquée, il y'a de nombreuses années, et étayée par trois arguments principaux en faveur de cette hypothèse :

- Les réarrangements chromosomiques, retrouvés avec une fréquence supérieure à la normale chez des hommes infertiles, peuvent être responsables d'un défaut de la méiose ou d'un dysfonctionnement d'un gène essentiel pour la spermatogenèse.
- Des cas familiaux d'infertilité ont été rapportés dans la littérature : la présence de consanguinité chez les parents de certains hommes ayant un problème de fertilité laisse supposer une transmission autosomique récessive de gènes impliqués dans la spermatogenèse.
- Le recours à des modèles animaux, en particulier la souris dont les mécanismes de contrôle de la spermatogenèse sont pratiquement identiques à ceux de l'homme, met en évidence que de nombreuses mutations géniques (spontanées ou induites) peuvent être à l'origine d'une infertilité (ou d'une hypofertilité) chez les mâles (Vialard *et al.*, 2009).

À l'heure actuelle, les anomalies chromosomiques, les microdélétions du chromosome Y et les mutations du gène **CFTR** sont des éléments de causalité démontrée. D'autres gènes tel que : **AURKC** (Aurora Kinase C), **SPATA16** (Spermatogenesis-associated protein 16), et **NR5A1** (Nuclear Receptor subfamily 5, group A, member 1) ont pu être formellement associés à des troubles de la spermatogenèse humaine (Bashamboo *et al.*, 2010 ; Coutton *et al.*, 2012).

1- Les anomalies chromosomiques :

Certaines anomalies chromosomiques sont associées à un syndrome clinique particulier, d'autres peuvent se révéler uniquement par un phénotype d'infertilité. Plusieurs recherches ont démontré que les hommes infertiles présentent 10 à 15 fois plus d'anomalies chromosomiques que dans la population générale (**Morel et al., 2004**). Il a été rapporté que 10 à 20 % des azoospermiques (préférentiellement sur les gonosomes) et 5 à 7 % des oligozoospermiques (préférentiellement sur les autosomes) ont une anomalie du caryotype (**Duzcan et al., 2006**).

Les aneuploïdies des gonosomes et les translocations réciproques sont les anomalies chromosomiques les plus fréquemment associées à une infertilité masculine. Ces différents remaniements sont des anomalies équilibrées, sans perte ni gain de matériel génétique (**De Braekeleer et al., 2006**).

2- Les microdélétions du chromosome Y :

La prévalence des microdélétions du chromosome Y chez les hommes infertiles est estimée à 7,6 %. Cela concernerait environ 10 % d'infertiles avec une azoospermie non obstructive et 6 % avec une oligozoospermie sévère. Différentes équipes ont suggéré que certaines fausses couches à répétition pourraient être corrélées à la présence de microdélétions du chromosome Y. Aucune microdélétion du chromosome Y chez des hommes normozoospermiques n'a été rapportée à ce jour. En revanche, il existe des microdélétions du chromosome Y chez des hommes fertiles mais qui, cependant, ne sont pas normozoospermiques. Il ne semble également pas y avoir d'association entre ces microdélétions et d'autres problèmes de santé (**Krausz et McElreavey, 2001**).

Une ou plusieurs microdélétions de toute ou d'une partie de la région AZF en Yq aurait lieu pendant la gamétogenèse ou pendant le développement pré-implantatoire et pourrait être la résultante d'une déficience des enzymes responsables de la réparation de l'ADN. Ces microdélétions résulteraient de recombinaison entre des blocs de séquences répétées flanquant les intervalles délétés (**Wallerand et al., 2003**). Il existe plusieurs microdélétions dépendamment des différents loci concernés localisées en Yq11.21-23. Ces différents loci ont été désignés comme étant AZFa (proximale), AZFb (centrale) et AZFc (distale) (**figure 9**).

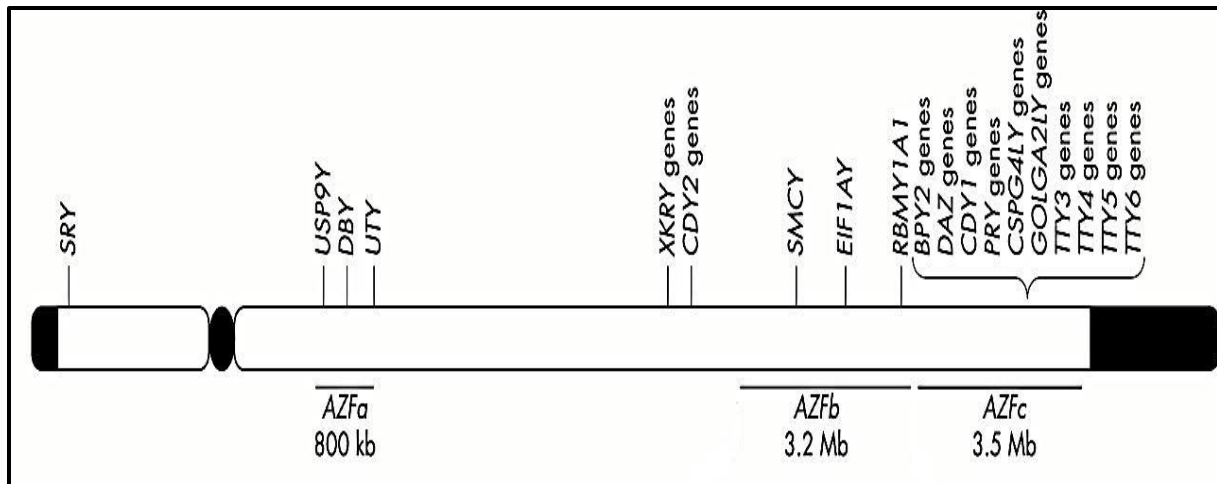


Figure 09 : Identification des régions AZF sur le chromosome Y humain (Ferlin *et al.*, 2003).

3- Le gène *CFTR* :

Le gène *CFTR* (OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) : 602421) responsable de la mucoviscidose, découvert en 1989, est situé sur le chromosome 7 au niveau de la région q31.2. Ce gène s'étend sur 250 kb, contient 27 exons (numérotés de 1 à 24 en dédoublant 6a/6b, 14a/14b et 17a/17) et 26 introns. Il est transcrit en un ARNm de 6500 pb (dont 4440 codantes), présent dans les différents tissus épithéliaux. Les séquences nucléotidiques responsables de l'expression tissu-spécifique sont actuellement inconnues (Riordan *et al.*, 1989).

Le gène *CFTR* code pour une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés ; un canal chlore régulant les transports d'eau et de sel de part et d'autre de la membrane plasmique des cellules épithéliales (Riordan *et al.*, 1989 ; Zielenski *et al.*, 1991).

Depuis l'identification de l'anomalie moléculaire majoritairement responsable de la mucoviscidose ; la mutation F508del (*CFTR*ΔF508 : délétion d'une phénylalanine en position 508), plus de 1600 mutations sont documentées et répertoriées au sein d'un consortium international d'étude des mutations du gène *CFTR* (CFMDB, <http://genet.sickkids.on.ca/cftr>).

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive touchant un enfant sur 2500 à 3000, qui fut bien décrite et considérée comme une entité pathologique distincte en 1938 par **Dorothy Andersen**. Dès 1971, le fait que l'Agénésie Bilatérale des Canaux Déférents (ABCD) pouvait être une forme génitale de la mucoviscidose a été évoqué (Holsclaw *et al.*, 1971 ; Dumur *et al.*, 1990).

L'ABCD est trouvée chez 6 à 8 % des hommes ayant une azoospermie excrétoire. La fréquence de mutation du gène *CFTR* chez les hommes porteurs d'une ABCD est très variable ; rapportée entre 36 et 86 % des hommes atteints. Cette variation étant en grande partie expliquée par le type et le nombre de mutations recherchées. Près de la moitié des patients présentant une ABCD sont porteurs d'une mutation fréquente et grave du gène *CFTR* ($\Delta F508$) à l'état hétérozygote contre 3 à 4 % dans la population générale. Il en est ainsi de l'allèle 5T dû à un polymorphisme polyT (3, 5, 7 ou 9T), situé dans l'intron 8 du gène *CFTR*, dont la fréquence chez les patients ABCD est jusqu'à six fois supérieure à celle dans la population générale. La particularité d'un allèle 5T est d'entraîner une maturation anormale des ARNm avec l'excision de l'exon 9 en même temps que celle des introns 8 et 9 ce qui aboutit à la synthèse d'une protéine tronquée inefficace (Ravel *et al.*, 2007 ; Yahia, 2007).

III- Polymorphismes géniques et infertilité masculine :

Certains polymorphismes de gènes impliqués dans le bon déroulement de la spermatogenèse sont considérés comme des facteurs de risque potentiels pouvant contribuer à la sévérité du défaut spermatogénique. Plusieurs variants ont été ainsi associés à la survenue d'infertilité masculine (Ferlin *et al.*, 2006 ; Ravel *et al.*, 2007).

1- L'ADN polymérase gamma (γ) (*POLG1*) :

L'ADN polymérase γ est une enzyme spécifique des mitochondries qui fut découverte en 1975 par Bertazzoni *et al*, sa localisation mitochondriale fut rapidement vérifiée en 1977 et son rôle dans la réplique de l'ADNmt a été prouvé en 1987 par. Basé sur les séquences de la *POLG* de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la forme humaine a été clonée en 1997 (Bolden *et al.*, 1977 ; Lestienne, 1987 ; Zullo *et al.*, 1997).

Cette enzyme est hétérodimérique chez l'homme ; elle est composée d'une sous-unité catalytique : ADN polymérase γ -1, POLG α ou POLGA codée par le gène *POLG1* (OMIM : 174763) (4500 pb, localisé en 15q25 et compte 23 exons) et d'une sous-unité accessoire, régulatrice : ADN Polymérase γ -2, POLG β ou POLGB codée par le gène *POLG2* (OMIM : 604983) (1564 pb, localisé en 17q23-24 et compte 8 exons). Leur composition comporte respectivement 1239 (140 kDa) et 485 (55 kDa) acides aminés (Stumpf *et al.*, 2013).

L'ADN polymérase γ est considérée comme la seule ADN polymérase réplique de la mitochondrie. Sa fidélité de réplique est bonne (inférieure à 2×10^{-6} erreurs par nucléotide). (Hudson et Chinnery, 2006).

La sous-unité catalytique possède une région polymérase comprenant un domaine 3'→5' exonucléasique qui peut expliquer la meilleure fidélité de cette ADN polymérase et un domaine 5'-désoxyRibose Phosphate lyase (5'-dRP lyase) (Zhang *et al.*, 2011). Cette dernière activité n'a été mise en évidence qu'au niveau de la forme humaine de cette enzyme.

La sous-unité accessoire (POLGB) est importante pour le maintien de l'efficacité catalytique et l'intégrité structurale de l'enzyme. Elle serait également impliquée dans la reconnaissance de l'amorce ARN dans la région D-Loop de l'ADNmt ainsi que pour la processivité de la synthèse de l'ADN polymérase γ (Holt, 2003).

Les facteurs de régulation de l'expression de *POLG1* sont peu connus. Elle fait intervenir *NRF-1* (Nuclear Respiratory Factor 1) qui est un facteur de transcription régulant l'expression de nombreuses protéines mitochondriales. L'expression de *NRF-1* est en lien avec le contenu cellulaire en ATP et il se lie au promoteur du gène *POLG1* (mais également de *POLG2* et de *TFAM*) (Hudson et Chinnery, 2006).

L'ADN polymérase γ est impliquée à la fois dans la réplication et la réparation de l'ADNmt. Deux processus de réparation de cet ADN coexistent : le Single Nucleotide-Base Excision Repair (SN-BER) et le Long-Patch-Base Excision Repair (LP-BER). Dans les 2 cas, une base est reconnue puis clivée par une glycosylase laissant un site abasique qui est clivé à son extrémité 5' par une endonucléase APE (Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease) pour générer une brèche portant un 5'dRP. POLG intervient dans les deux processus : dans le SN-BER elle vient remplir l'espace laissé précédemment et clive la partie 5'dRP avant l'intervention de la ligase III, dans le LP-BER, elle intervient par le même mécanisme mais le clivage de la partie 5'dRP est assuré par une endonucléase FEN-1 (Flap ENdonuclease) ainsi qu'une hélicase DNA2 (Stumpf *et al.*, 2013).

Une activité transcriptase inverse de POLG a également été mise en évidence *in vitro* mais sa signification *in vivo* reste peu claire (Murakami *et al.*, 2003).

Ainsi, l'ADN polymérase gamma est très importante pour l'intégrité du génome mitochondriale car des mutations de *POLG1* causent des délétions dans l'ADNmt. Ces mutations peuvent toucher à la fois des activités enzymatiques nécessaires à la réplication et la réparation mais aussi des sites d'interactions de cette enzyme avec d'autres protéines.

Un grand nombre de mutations et polymorphismes ont été rapportés sur *POLG1*. En effet, ce gène est très polymorphe avec des variations de séquence sur toute sa longueur (annexe IV). Les mutations pathogènes de *POLG1* sont, pour la plupart, des mutations faux-sens (92,5 %), 7,5 % sont de type non-sens. Les mutations altérant les sites d'épissage sont exceptionnelles (Wong *et al.*, 2008 ; Rouzier *et al.*, 2014).

Le premier lien entre une mutation du gène *POLG1* et une atteinte clinique, diagnostiquée dans une famille dont plusieurs membres sont atteints de PEO avec des transmissions autosomiques dominantes et récessives, a été établi en 2001 (**Van Goethem et al., 2001**). Aujourd'hui, les altérations de la *POLG1* représentent la majorité des causes de maladies mitochondriales chez l'adulte (**Van Goethem et al., 2003 ; Lax et al., 2011**).

Actuellement, 238 mutations ont été rapportées sur *POLG1* ; 87 d'entre elles sont considérées comme pathogènes dans au moins deux articles, 110 mutations n'ont été décrites comme pathogènes que dans un seul article. Enfin, 38 sont des polymorphismes et 3 ont un statut incertain. Le gène *POLG1* est en effet très polymorphe avec des variations de séquence sur toute sa longueur (<http://tools.niehs.nih.gov/polg>).

Parmi ces mutations : 105 sont répertoriées dans le domaine polymérase du gène, celles rapportées comme pathogènes induiraient pour la plupart une diminution de la synthèse d'ADN mitochondrial et dans quelques cas des délétions multiples. Dans la région intermédiaire, 58 mutations sont répertoriées, les mutations pathogènes de cette région conduiraient à une diminution de l'affinité de la sous-unité enzymatique pour la sous-unité accessoire ce qui induirait des délétions et des déplétions. Enfin, dans le domaine exonucléase de l'enzyme, il a été répertorié un total de 41 mutations aboutissant toutes à une mauvaise fidélité de la réplication de l'ADNmt (**Wong et al., 2008 ; Cohen et al., 2010**).

En plus des PEO, des mutations du gène *POLG1* peuvent entraîner de graves désordres neuro-musculaires, un syndrome d'Alpers, des ataxies et des neuropathies. Ces maladies et syndromes sont caractérisés par des délétions ou déplétions de l'ADNmt. La transmission de ces mutations est majoritairement autosomique récessive et le plus souvent les patients sont hétérozygotes composites impliquant les deux allèles du gène (**Stumpf et al., 2013**).

Dans le gène *POLG1* une répétition de 10 triplets répétés (CAG)_n codant pour une polyglutamine N-terminale a été rapportée. Une altération du nombre de répétition des triplets CAG peut être associée à une qualité spermatique diminuée et contribuer jusqu'à 5 voire 10 % des cas d'infertilité masculine dans les populations européennes (**Rovio et al., 2001**).

2- Le cytochrome P450 1A1 (*CYP1A1*) :

Les cytochromes P450 (CYP) forment une superfamille multigénique d'enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif de molécules très diverses, comprenant aussi bien des xénobiotiques que des substances endogènes. Chez l'homme, les cytochromes sont localisés principalement dans le réticulum endoplasmique et dans les mitochondries. Ils sont généralement ubiquitaires, présents pour la plupart dans le foie mais aussi dans de nombreux tissus importants. Certaines isoformes sont spécifiques d'un tissu donné (**Williams *et al.*, 2000 ; Ortiz de Montellano, 2004**).

Les réactions de biotransformation des xénobiotiques catalysées par les CYPs s'inscrivent dans un processus de détoxification évitant l'accumulation de substances potentiellement toxiques dans l'organisme. La grande diversité des molécules rencontrées a conduit, au cours de l'évolution, à une importante variabilité inter et intra-espèce en termes de profil métabolique. Il s'agit d'enzymes inductibles, en particulier par certaines hormones, médicaments ou polluants chimiques. Paradoxalement, ces enzymes peuvent parfois catalyser l'activation chimique de certains composés et produire des métabolites toxiques, mutagènes voire cancérogènes (**Ortiz de Montellano, 2004**).

De plus, les CYPs humains sont très polymorphes (<http://www.cypalleles.ki.se/>). Ceci peut modifier la susceptibilité à certaines pathologies ou modifier la réponse à certains traitements médicamenteux. On dénombre actuellement 17 familles de cytochromes P450 chez l'homme, comportant 49 gènes et 15 pseudogènes. Les formes prépondérantes de P450s sont représentées par les sous-familles *CYP1A*, *CYP2C* et *CYP3A*. Le *CYP1A2* est essentiellement exprimé au niveau du foie. À l'inverse, les *CYP1A1* et *CYP1B1* sont surtout des iso-enzymes retrouvées dans des tissus extra-hépatiques (**Nelson *et al.*, 1996**). Un polymorphisme génétique important pour plusieurs CYP conduisant à des niveaux d'expression enzymatiques très différents selon les individus traduisant des différences interindividuelles de susceptibilité à l'action des toxiques a été mis en exergue (**Genguerich, 2005**).

Le gène *CYP1A1* (OMIM : 108330) code pour une mono-oxygénase ; enzyme de détoxification inductible par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques et dans celui du cholestérol, des stéroïdes et autres lipides. Ce gène est localisé en 15q22-q24. Il contient 7 exons et 6 introns. Il comprend 5987 pb. Il est localisé à 25 kb du *CYP1A2* et code pour une protéine de 512 acides aminés (**Corchero *et al.*, 2001**).

Le gène *CYP1A1* est sous le contrôle d'un facteur de transcription ; le récepteur des hydrocarbures aromatiques AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor). L'expression de *CYP1A1* est à prédominance extra-hépatique. Le *CYP1A1* est exprimé dans le foie fœtal, mais son expression chez l'adulte n'est pas très importante. Par ailleurs, il est exprimé dans les poumons où des variations importantes dans les niveaux de *CYP1A1* ont été observées entre les individus. Cette isoenzyme est également retrouvée dans le placenta et dans les cellules sanguines périphériques (les lymphocytes et monocytes). De plus, l'ARNm associé au gène *CYP1A1* a été détecté dans d'autres tissus comme le pancréas, la prostate, le thymus, l'intestin grêle, le colon et les glandes mammaires et le testicule (Shimizu *et al.*, 2000). L'importance du *CYP1A1* vient du fait qu'il a toujours été associé avec le métabolisme de composés pro-cancérogènes en métabolites hautement cancérogènes (Vakharia *et al.*, 2001).

Plusieurs polymorphismes de *CYP1A1* ont été décrits dans la littérature ; quatre d'entre eux (**figure 10**) sont les plus étudiés pour leur implication dans plusieurs pathologies :

- **m1 (*CYP1A1**2 ou *CYP1A1**2A)** : sujet de notre étude, identifié en 1987, le polymorphisme T3801C (rs4646903) situé dans la région 3' non codante en aval du site de poly-adénylation a pour conséquence l'apparition d'un nouveau site de restriction *MspI*. Ce polymorphisme altère la stabilité de l'ARNm codé et le niveau d'expression du gène générant ainsi une protéine fortement inductible par les hydrocarbures et une activité enzymatique augmentée (Spurr *et al.*, 1987 ; Shah *et al.*, 2009).
- **m2 (*CYP1A1**2C)** : identifié en 1991, le polymorphisme A2455G (rs1048943) localisé dans l'exon 7 (codon 462) conduit à la substitution Ile462Val avec pour conséquence la disparition d'un site de restriction *BsrDI* (Hayashi *et al.*, 1991).
- **m3 (*CYP1A1**3)** : identifié en 1993, le polymorphisme T3205C dans la région 3' non codante en amont du site de poly-adénylation a pour conséquence l'apparition d'un nouveau site de restriction *MspI* (Crofts *et al.*, 1993).
- **m4 (*CYP1A1**4)** : identifié en 1996, le polymorphisme C2453A (rs1799814) dans l'exon 7 (codon 461) conduisant à la substitution Thr461Asn avec pour conséquence la disparition d'un site de restriction *BsaI* (Cascorbi *et al.*, 1996).

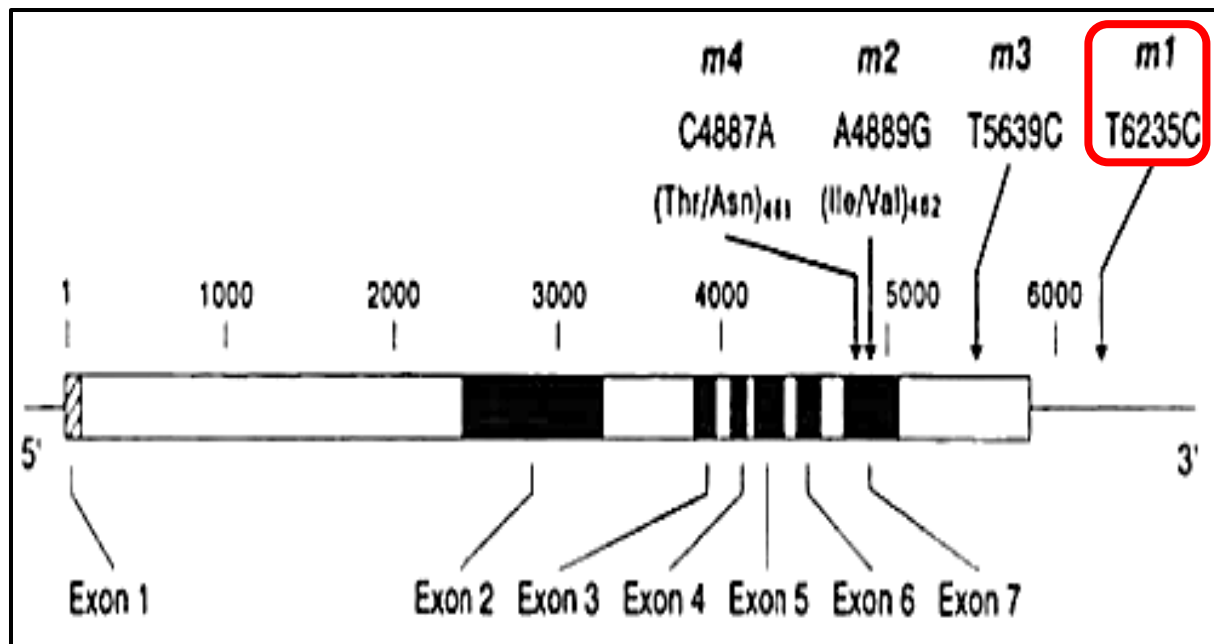


Figure 10 : Représentation schématique du gène *CYP11A1* avec les caractéristiques des polymorphismes m1, m2, m3 et m4 (Bartsch et Nair, 2000).

De nombreuses études ont prospecté l'implication du polymorphisme m1 dans la survenue de pathologies complexes, essentiellement cancéreuses (poumon, prostate et vessie) (Adala *et al.*, 2011). La première étude d'association du polymorphisme m1 comme facteur de risque de l'infertilité masculine idiopathique a été réalisée en 1998 (Fritsche *et al.*, 1998).

3- La 5-10 Méthylène Tétra-Hydro-Folate Réductase (*MTHFR*) :

La *MTHFR* est une enzyme clé dans le métabolisme des folates (acide folique ou vitamine B9). 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. L'homocystéine s'oriente soit dans la voie de la trans-sulfuration (où elle est convertie en cystéine par la cystathionine-synthétase utilisant comme cofacteur le phosphate de pyridoxal, forme biologiquement active de la vitamine B6), soit dans le cycle de reméthylation (où elle est reméthylée en méthionine sous l'influence d'une méthyltransférase dont le coenzyme est la méthyl-cobalamine provenant de la vitamine B12). Ces deux voies sont limitées à deux organes principaux qui sont le foie et le rein (Oltean et Banerjee, 2003 ; Fowler, 2005).

La *MTHFR*, flavoprotéine cytosolique, agit avec le FAD comme cofacteur pour catalyser la conversion irréversible de la 5,10- Méthylène Tétra-Hydro-Folate (5,10-MTHF) en 5- Méthylène Tétra-Hydro-Folate (5-MTHF) qui est la principale forme de folates circulantes.

L'acide folique, dans sa forme 5-méthyl, participe aux transferts de molécules carbonées qui ont lieu lors de la synthèse de nucléotides, de la synthèse de S-Adénosyl-Méthionine (SAM) et de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine. La MTHFR est également impliquée dans la synthèse des purines et pyrimidines. Elle est donc un élément essentiel à la provision de nucléotides nécessaires à la synthèse d'ADN et sa réparation (Akchiche, 2009).

L'activité de la MTHFR est augmentée lorsque le niveau cellulaire de méthionine est bas et lorsque les taux d'homocystéine sont augmentés (Böttiger, 2008).

La MTHFR joue un rôle central dans la méthylation de l'ADN, de protéines et de phospholipides. La méthylation de l'ADN est primordiale dans la régulation de l'expression des gènes et le maintien de la stabilité génomique. L'influence potentielle de son activité sur les phénomènes de synthèse et de réparation du matériel génétique présente la *MTHFR* comme un gène potentiellement impliqué dans la cancérogenèse. Des altérations dans les profils de méthylation ont été associées à un déficit en folates qui entraîne, outre des cassures simples ou doubles brins d'ADN, une hypométhylation de certains gènes suppresseurs de tumeur (Sohn *et al.*, 2009).

Chez l'homme, la MTHFR a deux isoformes de 77 et 70 kDa ; le site de démarrage de la traduction de l'isoforme de 77 kDa permet l'ajout de codons additionnels en amont de la séquence de l'isoforme de 70 kDa (Tran *et al.*, 2002).

La MTHFR est présente dans le cytoplasme, et localisée dans la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Son expression est plus intense dans le testicule, intermédiaire dans le cerveau et rein, et inférieure dans d'autres tissus (Goyette *et al.*, 1995).

Elle possède deux domaines : le domaine catalytique représenté par l'extrémité N-terminale de 40 KDa, liant le FAD (cofacteur), le NADPH (donneur d'électrons) et le MTHF (substrat) et le domaine de régulation à l'extrémité C-terminale de 37 KDa. Entre ces deux domaines se trouve une forte région hydrophobe avec une séquence d'acides aminés Lys-Arg-Arg-Glu-Glu constituant un site de clivage par la trypsine (Böttiger, 2008).

Le gène *MTHFR* (OMIM : 607093) est localisé sur le bras court du chromosome 1 (1p36.3), comporte 11 exons. Sa région promotrice contient plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription, mais ne possède pas de TATA box. L'exon 1 porte un site d'épissage alternatif ; la région UTR (UnTranslated Region) de ce gène est longue, montrant la complexité dans la régulation de l'expression. L'ADNc de la *MTHFR* humain est de 2,2 Kb de longueur, répartie en 11 exons de taille comprise entre 102 à 432 pb, chevauchés par 10 introns de taille comprise entre 25 pb à 1,5 Kb (avec une seule exception 4,2 Kb) (figure 11) (Gaughan *et al.*, 2000).

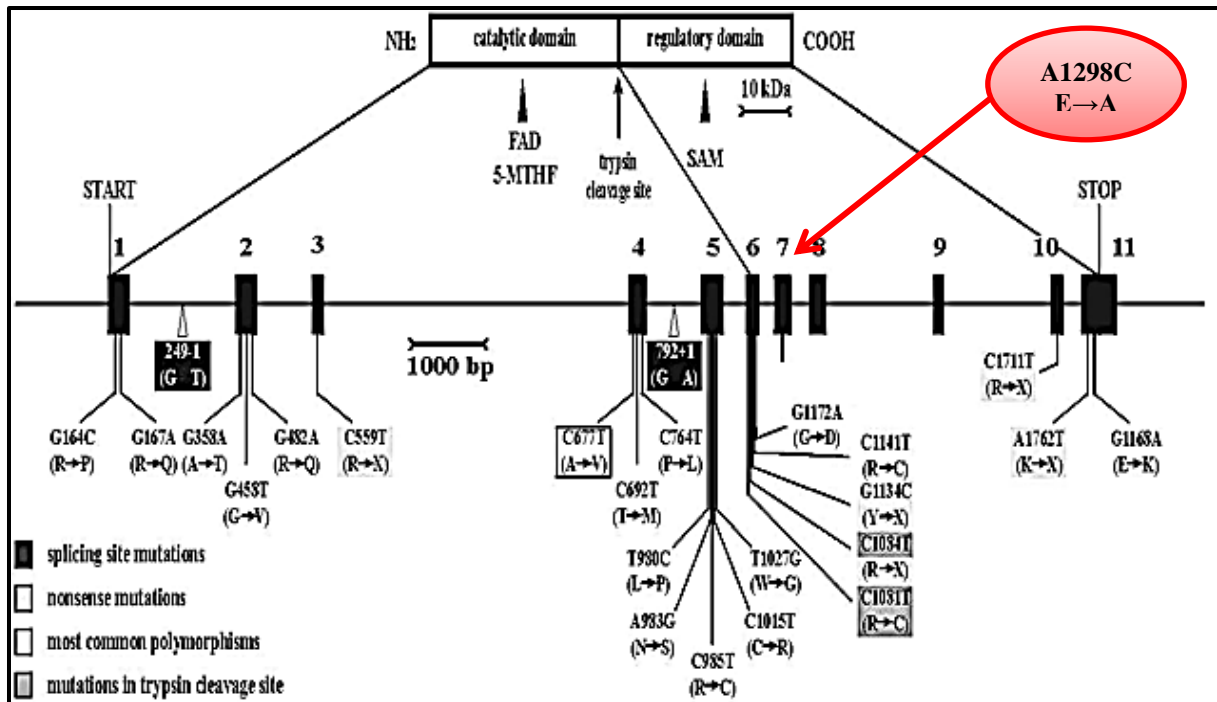


Figure 11 : Schéma de la structure du gène *MTHFR* et sa protéine avec indications des polymorphismes les plus communs (Szpecht-Potocka et Sliwerska, 2002).

Actuellement, un total de 41 mutations rares (observées dans une ou deux familles) mais nuisibles dans le gène *MTHFR*, aussi bien qu'approximativement une soixantaine de polymorphismes ont été rapportées, nous citons les deux polymorphismes les plus étudiés :

- **C677T** : identifié en 1995, la substitution d'une cytosine par une thymidine au niveau de la 677^{ème} pb (NCBI SNP ID : rs1801133) dans le quatrième exon (ENSE00001225832), aboutit à la substitution d'une alanine par une valine dans la séquence protéique au niveau du 222^{ème} acide aminé (Ala222Val). Ce polymorphisme rend la MTHFR thermolabile avec une diminution de 50 % de son activité (une baisse de l'activité enzymatique de l'ordre de 30 à 40 % pour les hétérozygotes et de 60 à 70 % pour les homozygotes a été décrite). Ce polymorphisme est reconnu comme la cause génétique la plus commune d'hyper-homocystéinémie (Frosst *et al.*, 1995).

- **A1298C** : ce deuxième polymorphisme a été identifié en 1998, la substitution d'une adénine par une cytosine au niveau de la 1298^{ème} pb au niveau du septième exon (ENSE00001225813) (rs1801131) entraîne le remplacement d'une glutamine par une alanine au niveau de l'enzyme (Glu429Ala). Ce polymorphisme n'entraîne pas une thermolabilité de l'enzyme mais diminue son activité ; diminution moins marquée que celle observée pour le SNP C677T (Van der Put *et al.*, 1998).

Ces deux polymorphismes C677T et A1298C sont situés à 2,1 kb de distance et sont en fort déséquilibre de liaison. Plusieurs études ont montré que ces deux SNP existent rarement sur le même allèle et que la combinaison des génotypes 677TT et 1298CC est très rarement retrouvée dans la population générale.

Ces polymorphismes, décrits ci-dessus, sont associés à une hypométhylation globale au niveau du génome qui pourrait être expliquée par l'altération de la méthylation de l'ADN attribuée à la disponibilité réduite de 5-MTHF. Un autre mécanisme est également évoqué, il s'agit d'un défaut d'incorporation des uridyates en ADN entraînant un taux accru de cassures de l'ADN et d'autres anomalies chromosomiques. Ainsi cette voie enzymatique est impliquée dans la stabilité de l'ADN. Par conséquent, une réduction de l'activité MTHFR aboutit à une augmentation du niveau cytoplasmique de 5,10 MTHF, ce qui préviendrait les carences du pool de nucléotides durant la synthèse d'ADN et donc protégerait les cellules des altérations d'ADN induites par une incorporation incorrecte d'uridyates. L'effet protecteur du polymorphisme de *MTHFR* disparaît en cas de carence en folates ou en cas d'importante consommation d'alcool qui interfère sur le métabolisme des folates (**Sohn et al., 2009**).

La présence de génotype *MTHFR* 677 TT ou *MTHFR* 1298 CC chez la femme en âge de procréer entraîne un risque de non fermeture du tube neural et de syndrome de Down chez le fœtus, ces polymorphismes ont également été impliqués dans l'apparition de démences et de maladie d'Alzheimer (**Böttiger, 2008**) ainsi que de nombreux cancers (**Izmirli, 2013**).

L'implication de ces polymorphismes dans l'infertilité masculine a été suggérée par des expériences menées en 2001 sur des modèles animaux et qui ont démontré que ce gène est fortement exprimé au niveau du testicule et ce en comparaison avec d'autres organes suggérant un rôle probable de cet enzyme dans la spermatogenèse (**Chen et al., 2001**).

Une autre étude menée en 2005 a démontré que l'invalidation du gène de la *MTHFR* rend les souris mâles infertiles ; histologie testiculaire anormale associée à une défaillance de la spermatogenèse, confortant ainsi son implication probable dans l'infertilité masculine (**Kelly et Neaga, 2005**). Une étude similaire menée en 2012 a conclu à l'implication de la *MTHFR* dans le développement précoce des cellules germinales (**Garner, 2012**).

De nombreuses études cas-témoins ont prospecté l'association entre infertilité masculine et les polymorphismes C677T et A1298C de la *MTHFR*. Les résultats obtenus confirment, en grande partie, le statut du C677T comme facteur de risque potentiel de l'infertilité masculine (**Zu et al., 2016**). Cependant, le rôle de l'A1298C reste assez controversé (**Liu et al., 2015**).

4- Autres gènes impliqués dans l'infertilité masculine :

Les effets phénotypiques des polymorphismes géniques sont eux-mêmes modulés par d'autres facteurs génétiques et/ou environnementaux. Il est donc probable que certains polymorphismes n'entraînent une altération de la spermatogenèse ou un défaut de fonction testiculaire qu'en présence d'un fond génétique particulier et/ou en présence de certains facteurs environnementaux favorisants. Déterminer la part relative de ces deux composantes représente l'un des défis majeur sur le chemin de la compréhension de la génétique des infertilités masculines (**Ferlin et al., 2006 ; Ravel et al., 2007**).

Tableau 1 : Bases génétiques de l'infertilité masculine ; recueil des gènes dont l'implication a été démontrée lors d'études publiées précédemment (liste non exhaustive) (**Hwang et al., 2010**).

Spermatogenèse anormale	<i>ATM, ATMAC, DAZL, ERCC2, GTF2A1L, JUN, NLRP14, NRB0B1, <u>POLG</u>, PRM1, PRM2, SDHA, SOX8, XRCC1, YBX2.</i>
Azoospermie	<i>APOB, ACSBG2, ART3, ATM, BOULE, BPY2, BRCA2, CDY1, CFTR, CREM, DAZ, DDX25, DDX3Y, DRFFY, ERCC1, ERCC2, FASLG, FHL5, FKBP6, HNRNPC, HSFY1, KLHL10, LAP3, MBOAT1, MEI1, MLH1, MLH3, MTR, NLRP14, PRDM16, RBMX, RBMY1A1, RBMY1F, SPATA16, SYCP1, SYCP3, TAF7L, TGIF2LX, TSPY, TSSK4, UBE2B, USP26, UTP14C, USP9Y, UTY, XPC, XPD, XRCC1, YBX2, ZNF230.</i>
Oligozoospermie	<i>MT-ATP6, EGF, FASL, H19 and MEST, KLHL10, PIGA, PRM1, PRM2, SHBG, SDHA, TSSK4, UBE2B, VASA.</i>
Asthénozoospermie	<i>AKAP3, AKAP4C, CATSPER2, DNMT3B, DHAH5, DNAH11, DNAL1, PDYN, GNA12, ADNmt, <u>MTHFR</u>, MT-ND4, PIGA, <u>POLG</u>, PPM1G, PRKARIA, SHBG, SPAG16, TEK11, TEK2, TPN1, TPN2, TXNDC3, haplotype T.</i>
Tératozoospermie	<i>AURKC, PRM1, PVRL2, SPATA16, SP1.</i>
Oligo-asthénozoospermie	<i>JUND, MT-ND4, NALP14.</i>
OATs	<i>MTRR, IL1B, SABP.</i>
Acrosome	<i>POIA3.</i>
Varicocèle	<i>MT-ATP6, MT-ATP8, CACNA1C, MT-CO1, MT-CO2, MT-ND3.</i>
Altérations de l'ADN	<i>GSTM1, AR, GSTM1 KIT, KITLG, IL1A, OAZ3, PRM1, TSPY, TSSK4, USP26, YBX2.</i>

*Les gènes impliqués également dans des cytopathies mitochondriales sont mentionnés en caractère gras. Les gènes prospectés par une étude cas-témoins dans cette thèse sont surlignés.

IV- Mitochondrie et infertilités masculines :

1- Implication de la mitochondrie dans la fertilité masculine :

Il est aujourd'hui admis que le pouvoir fécondant du sperme est directement lié à l'activité mitochondriale. Cependant, les mitochondries paternelles ne participent pas au développement embryonnaire précoce. En effet, le traitement par le cyanure des spermatozoïdes injectés dans un ovocyte ne perturbe pas le développement embryonnaire (Ahmadi, 1997 ; Ruiz-Pesini *et al.*, 2007).

Au cours de son long périple vers l'ovocyte, le spermatozoïde doit franchir plusieurs étapes. Il doit passer à travers le mucus cervical, se diriger vers l'utérus et finalement pénétrer la zone pellucide. Afin d'y parvenir, la motilité du spermatozoïde est essentielle. L'énergie requise pour ces diverses étapes dérive des mitochondries situées au niveau de la pièce intermédiaire du spermatozoïde. Les mitochondries fournissent l'ATP à l'axonème afin de donner la propulsion flagellaire. Une absence ou un dysfonctionnement des mitochondries empêcherait les spermatozoïdes de se frayer un chemin jusqu'au site de fécondation. Plusieurs études ont établi que la mobilité spermatique est directement dépendante de la phosphorylation oxydative (Ahmadi, 1997 ; Ruiz-Pesini *et al.*, 2007).

L'un des faits marquants de maturation mitochondriale durant la spermatogénèse est que celle-ci s'accompagne d'une diminution du nombre de copies d'ADNmt dans les cellules germinales. En effet, au cours de la spermiogénèse, il se produit un arrêt de la fonction répliquative de l'ADNmt. L'expression du facteur TFAM, codé par le génome nucléaire, nécessaire à l'initiation de la transcription et à la répliquative de l'ADNmt chute au stade spermatide parallèlement au nombre de copies d'ADNmt (Rantanen *et al.*, 2000).

Il a été déterminé que dans les spermatozoïdes normaux, le nombre moyen de copies d'ADNmt était particulièrement faible : 1 à 4, ce qui implique que la plupart des mitochondries spermatiques est dépourvue d'ADNmt voire que certains spermatozoïdes ne contiennent plus d'ADNmt.

Cette absence d'ADNmt dans les spermatozoïdes les plus féconds pourrait être en partie responsable de la non-transmission de l'ADNmt paternel à la descendance. La fonctionnalité de la chaîne respiratoire pourrait être maintenue dans le spermatozoïde mature jusqu'à la fécondation malgré l'absence d'ADNmt dans les mitochondries (Rantanen *et al.*, 2001).

Il a été montré que les transcrits mitochondriaux restaient stables et que la traduction des sous-unités de la CRM continuait activement dans les mitochondries spermatiques même en l'absence de répliquative de l'ADNmt. En parallèle, un taux plus important d'ADNmt a été

trouvé dans les spermatozoïdes anormaux. Ces spermatozoïdes issus des spermes anormaux contenaient un nombre de copies d'ADNmt 28 fois supérieur à celui contenu dans les spermatozoïdes issus de spermes normaux (Szuhai *et al.*, 2001).

Le taux d'ADNmt, témoin du processus de réduction mitochondriale, pourrait donc être un marqueur de la maturation spermatique.

2- Mutations de l'ADNmt et infertilité masculine :

La qualité spermatique est intimement liée aux fonctions mitochondriales, elles-mêmes, en partie, sous la dépendance de l'ADNmt. Plusieurs études sur la fertilité masculine se sont intéressées au génome mitochondrial du spermatozoïde tant au niveau qualitatif que quantitatif. Il a été envisagé que des mutations de l'ADNmt puissent avoir pour corollaire une altération des fonctions mitochondriales avec atteinte d'un ou plusieurs paramètres du sperme. Globalement, aucune mutation précise n'a formellement été incriminée de manière récurrente et spécifique dans les anomalies spermatiques (Folgero *et al.*, 1993 ; Spiropoulos *et al.*, 2002).

Chez des patients atteints de pathologies mitochondriales on retrouve effectivement une altération de la mobilité spermatique. Cependant, le rôle des mutations de l'ADNmt dans l'infertilité masculine est controversé (May-Panloup *et al.*, 2006).

2-1- Modifications qualitatives :

Les anomalies qualitatives de l'ADNmt peuvent altérer la qualité spermatique. Plusieurs études ont démontré qu'une délétion de l'ADNmt du spermatozoïde de 4977 pb serait associée à une baisse de la motilité et par le fait même à une baisse de la fertilité masculine. L'incidence de cette délétion de 4977 pb dans l'ADNmt serait plus fréquente chez les individus azoospermiques et oligozoospermiques que chez les normaux. De plus, elle est plus élevée chez les patients avec une infertilité primaire que secondaire. Selon cette même étude, aucune délétion n'a été retrouvée dans les spermatozoïdes d'hommes fertiles et en bonne santé (Kao *et al.*, 1998). De nombreuses observations ont rapporté des modifications qualitatives de l'ADNmt en rapport avec des infertilités masculines. En effet, une mutation T8821C du gène mitochondrial *ATPase 6* a été décrite comme pouvant entraîner une altération de la spermiogénèse (présence de spermatides immatures). Ces auteurs ont également constaté une forte incidence de SNPs dans le génome mitochondrial qui ont été associés à une mauvaise qualité du sperme (Holyoake *et al.*, 1999).

En 2002, chez un homme atteint de MELAS avec une mutation A3243G dans le gène mitochondrial *ARNt^{Leu}*, une diminution de la motilité des spermatozoïdes est constatée (**Spiropoulos et al., 2002**).

En 2003, il a été établi que les mutations de l'ADNmt dans le sperme peuvent entraîner une faible motilité des spermatozoïdes. Cette étude a rapporté 8, 13, 5 et 10 SNPs respectivement dans les gènes *COI*, *COII*, *ATPase 8* et *ATPase 6* dans l'ADNmt de sperme d'un homme oligo-asthénozoospermique (**Thangaraj et al., 2003**).

L'appartenance à un haplogroupe particulier (**annexe II**) pourrait déterminer une fonctionnalité mitochondriale spécifique avec une répercussion éventuelle sur ces performances. **Ruiz-Pesini et al** ont montré une corrélation entre différents génotypes d'ADNmt et la mobilité spermatique.

L'haplogroupe H était surreprésenté chez les patients normozoospermiques, alors que l'haplogroupe T l'était chez les patients présentant une asthénozoospermie modérée. Les hommes porteurs d'un haplogroupe T présentaient une activité des complexes I et IV significativement inférieure à celle retrouvée dans l'haplogroupe H, alors que l'activité du complexe II (uniquement codé par des gènes nucléaires) était équivalente dans les deux groupes. Cette baisse d'activité pourrait être liée à l'introduction, du fait de ces polymorphismes, de changements dans la séquence en acides aminés des sous-unités du complexe I (**Ruiz-Pesini et al., 2000**).

Les différences de qualité spermatique observées entre ces sous-groupes pourraient être le fait de variants dans les gènes *COIII* et *cytb* (**Montiel-Sosa et al., 2005**).

2-2- Modifications quantitatives :

Le fait que la maturation spermatique est accompagnée par une réduction du nombre de copies de l'ADNmt est admis. Cependant, les études menées sur cet aspect rapportent des valeurs différentes. La discordance entre les différents résultats de la littérature pourrait résulter de l'hétérogénéité des techniques utilisées pour la quantification du génome mitochondrial.

De même, la relation entre le taux d'ADNmt spermatique et la qualité spermatique est elle aussi peu consensuelle. En 2003, une étude a rapporté que le nombre de copies d'ADNmt est inférieur chez les hommes normozoospermiques par rapport à ceux présentant une asthénozoospermie (**Diez Sanchez et al., 2003**). Par la suite, ces résultats ont été confirmés par d'autres études (**Ruiz-Pesini et al., 2007**).

Partie pratique

Patients et méthodes

I- Patients et témoins :

1- Patients :

Les personnes incluses dans notre étude sont des hommes diagnostiqués infertiles, recrutés au niveau du laboratoire d'analyse médicale " Ibn-Sina " et du centre de procréation médicalement assistée " Ibn-Rochd " de la ville de Constantine. Trois types d'hommes infertiles ont été pris en compte : ceux présentant une azoospermie non obstructive, ceux présentant une oligozoospermie (avec ou sans hypogonadisme) et ceux avec une numération normale des spermatozoïdes mais dont le spermogramme fait apparaître une asthéo-tératozoospermie. Tous ces hommes, après lecture et explications, ont signé un consentement éclairé nous autorisant à l'utilisation de leurs données clinico-biologiques et de leur matériel génétique (ADN) dans la réalisation de cette étude (**annexe V**). Le recrutement des hommes infertiles en vue de l'analyse génétique s'est étendu de Mai 2011 à Mai 2014.

Dans cette étude, nous avons inclus 89 hommes infertiles. Selon les critères cités précédemment, les hommes souffrant d'une infertilité d'origine obstructive (biopsie testiculaire positive pour les azoospermiques), d'une cryptorchidie, d'une infection de l'appareil génital, d'une varicocèle (même modérée) et/ou d'une infertilité d'origine immunologique établie n'ont pas été inclus. Nous avons subdivisé notre population d'étude en trois sous-groupes en fonction des paramètres spermatiques : AZOospermiques (AZOs) avec absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat, Oligo-Asthéo-Tératozoospermiques (OATs) avec une numération, morphologie et mobilité des spermatozoïdes inférieures à la normale, et ASThénozoospermiques (ASTs) (classification établie selon les critères de l'OMS 2010 mentionnés dans l'**annexe III**) (**tableau 2**).

2- Témoins :

Un total de 84 hommes fertiles et en bonne santé apparente (après réalisation d'un questionnaire) ont été recrutés comme témoins dans cette étude. Une fertilité prouvée avec un enfant déjà né ou après réalisation d'un spermogramme qui révèle des paramètres spermatiques normaux (numération, morphologie et mobilité) selon les critères de l'OMS 2010.

Tableau 2 : Composition de la population d'étude.

Témoins (fertiles)	Infertiles		
	AZOs	OATs	ASTs
84	59	21	09

II- Méthodologie :

1- Analyse hormonale :

Le dosage des paramètres hormonaux : FSH (évaluation de la fonction sertolienne), testostérone (évaluation de la fonction leydigienne) et LH (permettant en cas d'hypotestostéronémie, de définir les étiologies de l'hypogonadisme) a été effectué sur des automates au niveau du laboratoire d'analyse médicale « Ibn-Sina » (Cobas[®] 6000 et Elecsys[®] 2010 de Roche diagnostics[®]) et au niveau du centre de procréation médicalement assistée « Ibn-Rochd » (Axsym[®] de Abbott[®]).

2- Analyse cytologique (spermogramme) :

Cet examen a été réalisé pour chaque infertile participant à notre étude au niveau des unités médicales citées précédemment dans le cadre de diagnostic, suivi thérapeutique d'une infertilité et/ou préparation à une PMA. Il s'agit d'une étude macroscopique, microscopique et physico-chimique du sperme qui permet d'identifier les altérations quantitatives (azoospermie, oligozoospermie) et/ou qualitatives (asthénozoospermie, tératozoospermie) des spermatozoïdes. Il est réalisé après 3 à 5 jours d'abstinence (OMS, 2010).

Remarque :

Les résultats des analyses hormonales et cytologiques n'ont pas été prospectés (statistiquement). Ils ne contribuent qu'à consolider les critères d'inclusion de notre population d'étude (hommes infertiles) et de la définir en sous-groupes (AZOs, OATs et ASTs).

3- Analyse génétique :

Après recrutement des infertiles et des témoins, l'extraction de l'ADN ainsi que l'étude des polymorphismes de la *MTHFR* (A1298C) et du *CYP11A1* (T3801C) s'est faite par PCR/Digestion (RFLP) au niveau du laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire de l'université Constantine 3. L'analyse moléculaire qui a suivi : séquençage de l'exon 2 du gène *POLG1*, PCR longue de l'ADNmt ainsi que la PCR quantitative en temps réel de l'ADN nucléaire vs ADNmt a été effectuée au niveau de la plateforme biologie moléculaire de l'hôpital Kremlin-Bicêtre - Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP), Paris, France.

3-1- Extraction d'ADN à partir de sang total :

3-1-1- Le prélèvement sanguin :

Le prélèvement sanguin (5 à 10 ml) destiné à l'extraction de l'ADN est recueilli dans des conditions stériles par ponction veineuse, dans un tube vacutainer contenant l'EDTA (Ethylene Diamino Tetracetic Acid) comme anticoagulant.

3-1-2- L'extraction de l'ADN :

Les leucocytes représentent la source d'ADN la plus facilement exploitable. La technique employée sur un prélèvement de sang total utilise un solvant inorganique, le NaCl. L'extraction se fait en trois étapes ; la préparation des leucocytes, l'extraction de l'ADN proprement dite et enfin la solubilisation (le protocole d'extraction de l'ADN utilisé est exposé dans l'**annexe VI**) (Miller *et al.*, 1988).

3-2- Détermination de la concentration, la pureté et de la qualité de l'ADN extrait :

La pureté ainsi que la concentration de l'ADN sont déterminées par spectrophotométrie à UV avec un Nanodrop[®] (Thermo Scientific Nanodrop[®] ND-1000). Il s'agit d'un spectrophotomètre qui ne nécessite pas l'utilisation de cuvette. Un volume de 2 µl de l'échantillon est déposé directement à l'extrémité d'un câble de fibre optique. Lorsque celui-ci est mis en contact avec un second câble par fermeture de l'appareil, l'échantillon est maintenu par une tension de surface et traversé par un signal lumineux. Il est possible ainsi de mesurer et de quantifier les ADN double comme simple brins. L'analyse de l'absorbance se fait par un logiciel (Nanodrop[®] 1000 v3.7) installé sur un ordinateur relié à l'appareil.

L'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines qui représentent les témoins de contamination absorbent à 280 nm. L'absorption (absorbance ou Densité Optique (DO)) est mesurée à 3 longueurs d'ondes différentes (230, 260 et 280) et deux rapport sont établis (260/280 et 260/230). Tous ces paramètres sont calculés automatiquement par le logiciel. En effectuant le rapport de DO 260/280, la pureté de l'ADN est déterminée en vérifiant une éventuelle contamination par les protéines ou par les ARN.

On considère que : l'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = DO\ 260/280$ est compris entre 1,6 et 2 ($1,6 < R \leq 2$), l'ADN est contaminé par les protéines si $R < 1,6$ et que l'ADN est contaminé par les ARN si $R > 2$.

La concentration de l'ADN est donnée directement en ng par μl . Cette concentration doit être idéalement supérieure à 50 ng/ μl pour optimiser les résultats de la PCR longue et du séquençage. Cependant, si la concentration est inférieure à cette valeur, des modulations de la quantité d'ADN (volume de prise) pourront être apportées. Les ADN purs sont conservés à + 4°C jusqu'à utilisation (ou congelés à -80°C en cas de conservation pour une longue durée).

Après dosage, une deuxième vérification de la qualité de l'ADN extrait est réalisée par migration sur gel d'agarose à 1 % (1 g dans 100 ml) pendant une heure et à 90 Volts. L'apparition de « trainées » est témoin d'une dégradation partielle ou totale de l'ADN extrait (génomique et/ou mitochondrial).

Pour la réalisation des techniques de biologie moléculaire mentionnées précédemment sur notre population d'étude et pour enrayer de possibles biais que peuvent induire des volumes de prises trop faibles (source d'erreurs), nous avons procédé au préalable à des dilutions de nos échantillons d'ADN au ≈ 100 ng/ μl dans de l'eau distillée. La concentration ainsi que les rapports 260/280 et 260/230 sont remesurés de nouveau sur le Nanodrop®.

3-3- Séquençage de la *POLG1* (screening de l'exon 2) :

3-3-1- Amplification de l'exon 2 :

Pour une réaction de séquençage par la méthode de Sanger sur le gène de la *POLG1* (OMIM : 174763), il est nécessaire de disposer, tout d'abord, d'une grande quantité de fragments à séquencer (amplicons). L'amplification se fait par PCR en utilisant une paire d'amorces spécifiques. Pour séquencer la totalité de l'exon 2 (ENSE00000943530) dans le cadre d'étude du polymorphisme de répétition CAG ainsi que d'autres mutations et/ou SNP (substitution, insertion ou délétion) associés, nous avons procédé à l'amplification de ce dernier en deux amplicons 2.1 et 2.2 (respectivement de l'extrémité 5' vers 3'). Chacune des deux régions va être séquencée séparément pour optimiser le rendement de la technique. La séquence ciblée ainsi que la stratégie du séquençage utilisée sont représentées schématiquement dans l'**annexe VII**.

Pour le polymorphisme de répétition CAG, la forme dite « sauvage » (10 répétition CAG, de la position 181 à 210) se présente comme suit : **CGG (CAG)₁₀ CAA CAG CAG** alors que les formes dites « mutées » présentent un nombre de répétitions différent de 10, soit 6 à 15 (l'allèle est désigné par « not10 » ou « $\neq 10$ »).

Pour la comparaison des séquences obtenues, nous avons fait appel à la base de données NIH (National Institute of Environmental Health Science) / Human DNA Polymerase Gamma Mutation Database : <http://tools.niehs.nih.gov/polg/>

Les caractéristiques des deux paires d’amorces utilisées sont mentionnées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Séquences des amorces (Forward (F) et Reverse (R))
utilisées pour la PCR de l’exon 2 de la *POLG1*.

Amorce	Séquence (5'→3')	Nucléotide de départ	Taille de la région amplifiée (pb)
2.1 (F)	CCACGTCTTCCAGCCAGTAA	956	414
2.1 (R)	GCTTCTGCAGGTGCTCGAC	1369	
2.2 (F)	CGAGCAAATCTTCGGGCA	1293	500
2.2 (R)	CCCGTAACAGGACCTCAGAA	1792	

Solution d’amorces préparée par une dilution au 1/10^{ème} à partir de la solution mère : 20 µl (F) + 20 µl (R) + 360 µl d’eau bi-distillée.

La réaction d’amplification est réalisée dans des plaques de PCR (Fortitude) avec un thermocycleur (BIO-RAD® iCycler). Les réactifs utilisés pour la préparation du milieu réactionnel de la PCR ainsi que les quantités nécessaires pour chaque tube sont mentionnées dans le tableau 4. La préparation du milieu réactionnel de la PCR se fait à température ambiante.

Tableau 4 : Composition du milieu réactionnel de la PCR pour
l’amplification de l’exon 2 de la *POLG1*.

Réactif	Vol/tube (µl) 2.1	Vol/tube (µl) 2.2
ADN (~50ng)	2	2
Tampon 10X (Sans MgCl ₂)	5	5
désoxyribo-Nucléotides Tri-Phosphates (dNTP) 2mM	5	5
MgCl ₂ 25Mm	4	4
Di-Méthyl-Sulf-Oxyde (DMSO)	2,5	2,5
Taq Polymérase (Gold® 250U)	0,5	0,5
H ₂ O bi-distillée	27	27
Amorces 2.1 (F et R)	4	
Amorces 2.2 (F et R)		4
Total	50	50

Tableau 5 : Programme du thermocycleur pour l'amplification de l'exon 2 de la *POLG1* (durée : 2 heures).

Processus	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	10 minutes	1
Dénaturation	94	30 secondes	35
Hybridation	60	30 secondes	
Élongation	72	45 secondes	
Élongation finale	72	7 minutes	1

Deux plaques de PCR (96 puits pour chaque plaque) sont lancées ; une pour la partie 2.1 de l'exon 2 et l'autre pour la partie 2.2 du même exon (pour les témoins, nous avons lancé uniquement le 2.1).

3-3-2- Migration sur gel d'agarose :

La qualité des produits de PCR (amplicons 2.1 et 2.2) obtenus est vérifiée par migration sur gel d'agarose (NuSieve[®]) à 2 % préparé avec du Bromure d'ETHidium (BET) (1 goutte par 100 ml). À 4 µl de produit de PCR on ajoute 3 µl de Bleu de Bromo-Phénol (BBP) (dilué au 1/2 dans le TBE (Tris-Borate-EDTA)1X). On dépose sur gel d'agarose et on applique un courant électrique de 100 V pendant 30 minutes en présence du marqueur de taille V (Marquer V - 0,1 à 1,5 Kpbs, Roche[®]) (les caractéristiques du marqueur de taille utilisé sont mentionnées dans l'**annexe VIII**).

La migration se fait sur un gel à 96 puits. La réussite de la PCR se traduit par une bande nette. La confrontation des photos des deux gels 2.1 et 2.2 permet de confirmer la réussite de l'amplification pour les deux couples d'amorces.

Dans le cas de présence d'une bande secondaire sur le gel (cela conduit à une séquence double), il est nécessaire d'optimiser l'amplification par des conditions plus stringentes (en augmentant la température d'hybridation et en diminuant la concentration de MgCl₂).

Pour les échantillons dont l'amplification de l'exon 2 n'a pas fonctionné deux fois d'affilée, et pour vérifier s'il ne s'agissait pas d'une délétion (partielle ou totale) du gène *POLG1*, nous avons procédé à une PCR en utilisant une autre paire d'amorces (amplifiant un autre gène nucléaire de référence) ; l'*ATP Synthase β* (OMIM : 102910). Le matériel, les réactifs ainsi que le mode opératoire (procédé d'amplification et migration) sont identiques à ceux utilisés pour la *POLG1*, seules diffèrent les caractéristiques des amorces employées (**tableau 6**).

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées
pour la vérification de la délétion de *POLG1* (*ATP Synthase β*).

Amorce	Séquence (5'→3')	Nucléotide de départ	Taille de la région amplifiée (pb)
<i>ATP Synthase β</i> (F)	CTGACTGTGGCTGAATACTT	964	195
<i>ATP Synthase β</i> (R)	CCCTTCTTGGTAGTGGTAAT	1160	

Solution d'amorces préparée par une dilution au 1/10^{ième} à partir de la solution mère : 20 µl (F) + 20 µl (R) + 360 µl d'eau bi-distillée.

Enfin, la non visualisation de bande(s) dans la case qui correspond au blanc est le témoin de l'absence de contaminations.

3-3-3- Purification des produits de PCR (AMPure[®]) :

Avant de pouvoir séquencer notre amplicon, il est indispensable de purifier les fragments amplifiés en enlevant les restes des dNTP et d'amorces non incorporées. Pour la purification des produits de PCR, nous avons privilégié la méthode AMPure[®] à l'ExoSAP-IT[®], fonctionnant sur le principe de « nettoyage enzymatique ».

La purification AMPure[®] se fait sur un automate BIOMEK[®] NX^P (Beckman-Coulter). Dans des plaques de PCR (Fortitude), on transfère 20 µl de produits de PCR par puits auquel l'automate ajoute de l'AMPure[®] XP (45 µl par tube) et de l'éthanol 70 % préparé extemporanément (55 µl par tube).

Après 45 minutes on aura de 60 à 120 µl de produits de PCR purifiés par puits (volume dépendant de la quantité d'eau bi-distillée ajoutée en fonction de la qualité des bandes visualisées après migration des amplicons sur gel d'agarose).

Les échantillons (20 µl du produit de PCR de chaque puits de la plaque) sont placés dans un tube de 1,5 ml, puis 45 µl de « billes » remises en suspension par agitation y sont ajoutées et mélangées par aspiration à la pipette. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, les fragments de plus 100 pb sont reliés aux billes.

Le tube est placé sur un aimant pendant 2 minutes puis le surnageant est éliminé. Il s'en suit un lavage répété 3 fois avec 75 µl d'éthanol à 70 % suivi d'un séchage pendant 2 minutes à température ambiante pour éliminer toute trace d'éthanol.

Les billes sont alors remises en suspension par pipetage dans un tampon d'élution (EB, Qiagen[®]). Après 2 minutes d'aimantation, le surnageant contenant le produit de PCR purifié est isolé (**annexe IX**).

3-3-4- Préparation des plaques de séquences (réaction de séquençage) :

Pour le séquençage de l'exon 2 de la *POLG1*, on prépare 4 plaques de séquences : 2 plaques 2.1 (F et R) et 2 plaques 2.2 (F et R). La réaction de séquençage utilisée est une variante de la technique Sanger qui repose sur l'incorporation aléatoire par l'ADN polymérase de di-désoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphates (ddNTP) dits « interrupteurs de chaîne » (ou « Terminators » en Anglais) présents dans le milieu réactionnel (Sanger *et al.*, 1977). Nous avons opté pour la technologie BigDye® Terminator version 1.1 (Applied Biosystems®) pour notre réaction de séquençage (**annexe X**).

Il s'agit d'une réaction de PCR classique qui se fait sur un thermocycleur (BIO-RAD® iCycler) avec un milieu réactionnel particulier. La distribution des produits de PCR purifiés (2 µl par puits) se fait par l'automate BIOMEK® NX^P.

Les réactifs utilisés pour la préparation du milieu réactionnel de séquençage ainsi que les quantités nécessaires pour chaque tube sont mentionnées dans le tableau 7. La préparation de ce milieu réactionnel se fait à température ambiante.

Tableau 7 : Composition du milieu réactionnel de séquençage pour les plaques de séquences l'exon 2 de la *POLG1*.

Réactif	Vol/tube (µl) Mix 2.1 (F)	Vol/tube (µl) Mix 2.1 (R)	Vol/tube (µl) Mix 2.2 (F)	Vol/tube (µl) Mix 2.2 (R)
Produit de PCR	2	2	2	2
BigDye Terminators®	1	1	1	1
Tampon BigDye Terminators® 5X	2	2	2	2
H ₂ O bi-distillée	4,5	4,5	4,5	4,5
Amorce 2.1 (F)	0,5			
Amorce 2.1 (R)		0,5		
Amorce 2.2 (F)			0,5	
Amorce 2.2 (R)				0,5
Total	10	10	10	10

Solutions d'amorces préparées séparément par une dilution au 1/10^{ième} à partir de la solution mère : 20 µl (F) ou (R) + 180 µl d'eau bi-distillée.

Tableau 8 : Programme du thermocycleur pour la réaction de séquençage (durée : 2 heures 30 minutes).

Processus	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	5 minutes	1
Dénaturation	96	10 secondes	20
Hybridation	50	5 secondes	
Élongation	60	4 minutes	

3-3-5- Purification des produits de séquençage (CleanSEQ®) :

Avant le passage des plaques préparées précédemment sur le séquenceur, une purification des produits de séquençage (élimination des colorants) est nécessaire. Nous avons utilisé pour ce procédé le kit Agencourt® CleanSEQ®.

Dans des plaques de séquenceur (Optiques), on transfère 20 µl de produits de la réaction de séquençage par puits auquel l'automate BIOMEK® NX^P (Beckman-Coulter) ajoute 1,2 ml de CleanSEQ® XP (10 µl par puits) et de l'éthanol 85 % préparé extemporanément (42 µl par tube). Après 45 minutes, on aura un volume de 12 µl de produits de séquençage purifié par puits (**annexe XI**).

3-3-6- Séquençage des plaques sur l'appareil :

Le séquençage se fait sur un séquenceur 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems®) (les caractéristiques techniques ainsi que le mode de fonctionnement de l'appareil utilisé sont détaillés dans l'**annexe XII**). Les résultats de l'analyse sont formulés dans des fichiers (.ab1) et ce pour chaque séquence.

L'analyse des résultats ainsi obtenus se fait en utilisant le logiciel Sequencher® V5.3 (genecodes® corporation).

Après lecture de la séquence d'intérêt, la comparaison est effectuée avec une séquence de référence de la région d'intérêt tirée de banques de données sur internet : NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ou Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>).

3-4- Génotypage du *CYP1A1* :

Afin de génotyper notre population pour le polymorphisme d'intérêt du gène *CYP1A1* nous avons été amené à réaliser une technique de PCR-RFLP. Cette technique est basée sur le fait que la présence de l'allèle muté crée ou entraîne la disparition d'un site de coupure pour une enzyme de restriction donnée.

On amplifie par PCR un segment d'ADN spécifique de la région d'intérêt contenant la mutation ponctuelle étudiée. Le produit d'amplification est ensuite digéré par une enzyme de restriction adéquate et les produits de digestion sont séparés par électrophorèse. Le profil électrophorétique de digestion ainsi obtenu permet de constater la présence ou l'absence d'une coupure enzymatique du produit amplifié, révélant la présence ou l'absence du polymorphisme.

3-4-1- Amplification de la région 3' non codante du *CYP1A1* :

Pour prospecter le polymorphisme T3801C (rs4646903) (région 3' non codante) (connu également sous la désignation de l'allèle m1) du gène *CYP1A1* (OMIM : 108330), nous avons amplifié par PCR la région 3' non codante en utilisant une paire d'amorces spécifiques.

Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de la région 3' non codante du *CYP1A1*.

Amorces	Séquence (5'→3')	Taille de la région amplifiée (pb)
<i>CYP1A1</i> (F)	CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT	340
<i>CYP1A1</i> (R)	TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT	

Solution d'amorces préparée séparément pour (F) et (R) par une dilution au 1/6^{ième} à partir de la solution mère : 10 µl (F) ou (R) + 50 µl d'eau bi-distillée.

Les réactifs utilisés pour la préparation du milieu réactionnel de la PCR ainsi que les quantités nécessaires pour chaque tube sont mentionnées dans le tableau ci-après. La préparation du milieu réactionnel de la PCR se fait dans la glace.

Tableau 10 : Composition du milieu réactionnel de la PCR pour l'amplification de la région 3' non codante du *CYP1A1*.

Réactif	Vol/tube (µl)
ADN (~50ng)	2
Tampon 10X (Sans MgCl ₂)	2
dNTP 2Mm	3,20
MgCl ₂ 50Mm	0,60
Taq Polymérase (Bioline® 250U)	0,16
H ₂ O bi-distillée	8,04
Amorces (F)	2
Amorces (R)	2
Total	20

Tableau 11 : Programme du thermocycleur pour l'amplification de la région 3' non codante du *CYP1A1* (durée : 108 minutes).

Processus	Température (°C)	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95	4 minutes	1
Dénaturation	95	30 secondes	40
Hybridation	61	30 secondes	
Élongation	72	30 secondes	
Élongation finale	72	4 minutes	1

Les produits de PCR sont stockés à 4°C jusqu'à utilisation.

3-4-2- Digestion et migration sur gel d'agarose :

Le polymorphisme T3801C fait apparaître un site de restriction supplémentaire pour *HpaII* (enzyme extraite de la bactérie *Haemophilus parainfluenzae* (American Type Culture Collection (ATCC) 49669) ou celui de son isoschizomère *MspI* extraite de bactéries du genre *Moraxella* (ATCC 49670).

Les produits de PCR sont mis en incubation pendant 5 heures à 37°C dans l'étuve en présence de l'enzyme de restriction *HpaII* (ou *MspI*) (Kit BioLabs®) et du tampon de digestion 1X (CutSmart® Buffer) (Kit BioLabs®). La digestion est stoppée par immersion dans un bain marie à 80°C pendant 20 minutes.

La migration des produits de PCR digérés et colorés au BBP (dilué au 1/2 dans le TBE1X) se fait sur un gel d'agarose (UltraPure™ Agarose) à 3 % préparé avec du BET. La migration se fait sous un courant à 100V pendant 2 heures et en parallèle avec le marqueur de taille XIV (Marquer XIV - 100 pb, Roche®) (annexe VIII).

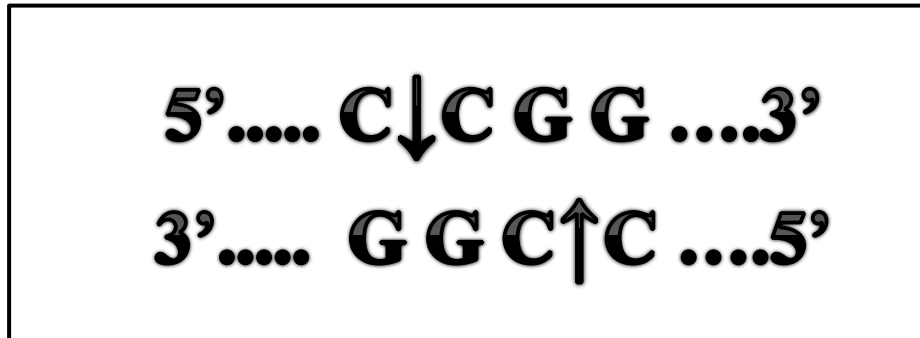
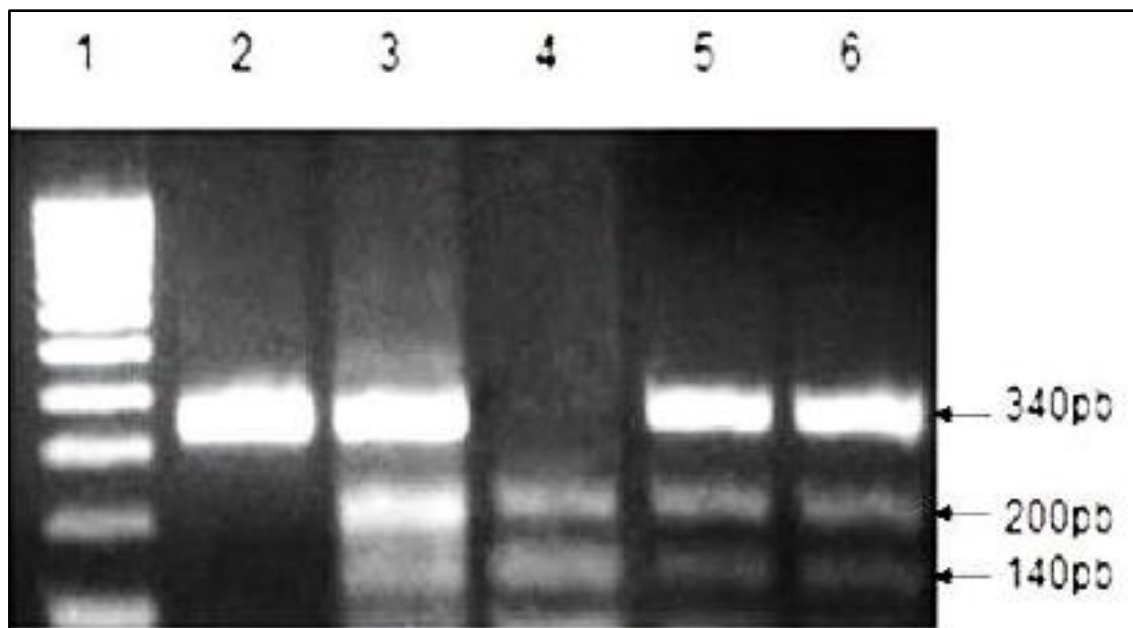


Figure 12 : Représentation schématique du site de restriction de l'enzyme *HpaII*.



Photographie 1 : Analyse par RFLP du polymorphisme T3801C du *CYP1A1* sur un fragment PCR digéré par *HpaII* (Lu *et al.*, 2008).

La colonne 1 désigne le marqueur de taille utilisé. La colonne 2 représente le génotype TT (fragment de 340 pb). Les colonnes 3, 5 et 6 représentent le génotype TC (fragments de 140, 200 et 340 pb). La colonne 4 représente le génotype CC (fragments de 140 et 200 pb).

3-5- Génotypage de la *MTHFR* :

Afin de génotyper le gène *MTHFR* pour le polymorphisme d'intérêt, nous avons utilisé le même procédé décrit précédemment pour le génotypage du *CYP1A1*.

3-5-1- Amplification de l'exon 7 de la *MTHFR* :

Pour prospecter le polymorphisme A1298C (Glu429Ala) (rs1801131) du gène *MTHFR* (OMIM : 607093), nous avons procédé à une amplification partielle par PCR de l'exon 7 (ENSE00001225813) en utilisant une paire d'amorces spécifiques.

Tableau 12 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification partielle de l'exon 7 de la *MTHFR*.

Amorces	Séquence (5'→3')	Taille de la région amplifiée (pb)
<i>MTHFR</i> E429A (F)	CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC	163
<i>MTHFR</i> E429A (R)	CACTTTGTGACCATTCCGGTTG	

Solution d'amorces préparée séparément pour (F) et (R) par une dilution au 1/6^{ième} à partir de la solution mère : 10 µl (F) ou (R) + 50 µl d'eau bi-distillée.

Les réactifs utilisés pour la préparation du milieu réactionnel de la PCR ainsi que les quantités nécessaires pour chaque tube sont mentionnés dans le tableau 13.

La préparation du milieu réactionnel de la PCR se fait dans la glace.

Tableau 13 : Composition du milieu réactionnel de la PCR pour l'amplification partielle de l'exon 7 de la *MTHFR*.

Réactif	Vol/tube (µl)
ADN (~50ng)	2
Tampon 10X (Sans MgCl ₂)	2
dNTP 2Mm	3,20
MgCl ₂ 50Mm	0,60
Taq Polymérase (Bioline® 250U)	0,16
H ₂ O bi-distillée	8,04
Amorces (F)	2
Amorces (R)	2
Total	20

Tableau 14 : Programme du thermocycleur pour l'amplification partielle de l'exon 7 de la *MTHFR* (durée : 108 minutes).

Processus	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	4 minutes	1
Dénaturation	95	30 secondes	40
Hybridation	67	30 secondes	
Élongation	72	30 secondes	
Élongation finale	72	4 minutes	1

Les produits de PCR sont stockés à 4°C jusqu'à utilisation.

3-5-2- Digestion et migration sur gel d'agarose :

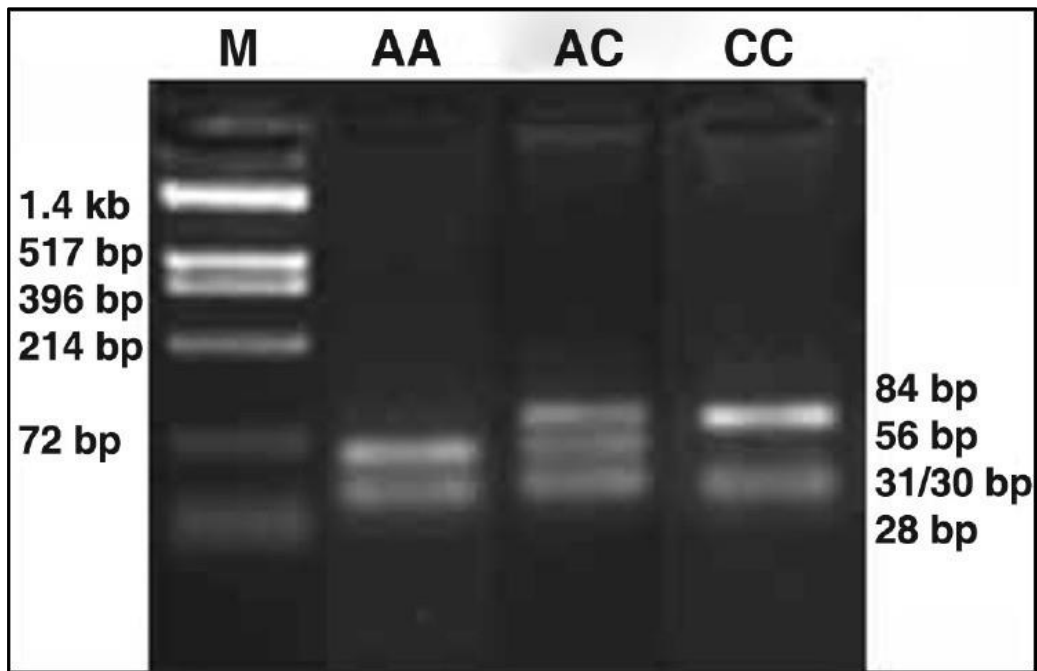
Le polymorphisme A1298C de la *MTHFR* fait disparaître de l'exon 7 de ce gène le site de restriction *Mbo*II (enzyme extraite de la bactérie *Moraxella bovis* ATCC 10900).

Les produits de PCR sont mis en incubation pendant 5 heures à 37°C dans l'étuve en présence de l'enzyme de restriction *Mbo*II (Kit BioLabs®) et du tampon de digestion 1X (CutSmart® Buffer) (Kit BioLabs®). La digestion est stoppée par immersion dans un bain marie à 80°C pendant 20 minutes.

La migration des produits de PCR digérés et colorés au BBP (dilué au ½ dans le TBE1X) se fait sur un gel d'agarose (UltraPure™ Agarose) à 3 % préparé avec du BET. La migration est lancée à 100V pendant 2 heures et en parallèle avec le marqueur de taille XIV (Marquer XIV - 100 pb, Roche®) (**annexe VIII**).



Figure 13 : Représentation schématique du site de restriction de l'enzyme *Mbo*II.



Photographie 2 : Analyse par RFLP du polymorphisme A1298C de la *MTHFR* sur un fragment PCR de 163 pb digéré par *MboII* (Li *et al.*, 2014).

Le polymorphisme A1298C abolit un site de restriction *MboII*. La digestion de l'amplicon de 163 pb du génotype 1298AA donne cinq fragments, de 56, 31, 30, 28 et 18 pb, alors que celle du génotype 1298CC donne quatre fragments, à savoir, 84, 31, 30, et 18 pb. Les fragments de 30 et 31 pb apparaissent sur la même bande alors que ceux de 18 pb seront rejetés hors gel.

3-6- PCR longue de l'ADNmt :

3-6-1- Amplification de l'ADNmt :

La PCR longue est une variante de la PCR classique utilisée pour l'amplification des fragments de grande taille ; idéale pour l'amplification du génome mitochondrial (16569 pb). Cette amplification est obtenue en utilisant un Kit TaKaRa® dont la polymérase possède une activité d'extension élevée et une activité d'édition de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' du brin néo-synthétisé.

La PCR longue de l'ADNmt appliquée pour toutes nos cohortes d'infertiles et de témoins a un intérêt double :

- (a) Prospecter la présence d'éventuelles macro-délétions de l'ADNmt,
- (b) Constitution d'une banque de l'ADNmt pour un usage ultérieur (séquençage).

La stratégie d'obtention de l'ADNmt consiste en la fabrication, par PCR, de deux amplicons en utilisant deux paires d'amorces spécifiques XL1/XL2 et OF/BR (généralisant respectivement des amplicons de 15647 et de 2984 pb) couvrant ainsi la totalité de la séquence de l'ADNmt.

En effet, pour compléter l'action du couple d'amorces XL1/XL2 qui ne permet pas d'amplifier la totalité de l'ADNmt (environ 94 % seulement, comprenant toute les régions codantes), on a recours à l'utilisation d'une autre paire d'amorces (OF/BR) qui permet d'amplifier la région omise par XL1/XL2 (contenant pratiquement toutes les séquences de régulation). L'utilisation combinée de ces deux couples permet d'amplifier et de disposer de la totalité de l'ADNmt.

Les caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNmt sont mentionnées dans le tableau 15.

Tableau 15 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR longue de l'ADNmt.

Amorces	Séquence (5'→3')	Nucléotide de départ	Taille de la région amplifiée (pb)
XL1(F)	CCCACAGTTTATGTAGCTTACCTCCTCA	574	15647
XL2(R)	TTGATTGCTGTACTTGCTTGTAAGCATG	16220	
OF(F)	CCTCACAGGTTTCTACTCAA	13491	2984
BR(R)	CGGTCTGAACTCAGATCACGTA	16475	

Solution d'amorces préparée par une dilution au 1/10^{ième} à partir de la solution mère : 20 µl (F) + 20 µl (R) + 360 µl d'eau bi-distillée.

Les réactifs utilisés pour la préparation du milieu réactionnel de la PCR longue ainsi que les quantités nécessaires pour chaque tube sont présentés dans le tableau 16. La préparation du milieu réactionnel de la PCR se fait dans la glace.

Tableau 16 : Composition du milieu réactionnel de la PCR longue de l'ADNmt.

Réactif	Vol/tube (µl) (XL1/XL2)	Vol/tube (µl) (OF/BR)
H ₂ O bi-distillée	32	32
Tampon 10X (Mg ²⁺ plus, Kit TaKaRa®)	5	5
Taq Polymérase (Kit TaKaRa® 5U)	0,5	0,5
dNTP (Kit TaKaRa® 2,5 Mm chacun)	8	8
Amorces (XL1/XL2)	3	
Amorces (OF/BR)		3
ADN (minimum 100 ng)	1 à 5	1 à 5
Total	50	50

Une fois le milieu réactionnel de la PCR préparé et l'échantillon d'ADN ajouté, le programme d'amplification est lancé immédiatement. Il s'agit d'un programme spécifique répondant à la contrainte de la taille des régions amplifiées. Les détails du programme utilisé sont mentionnés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Programme du thermocycleur pour l'amplification de l'ADNmt lors de la PCR longue (durée : 8 heures).

Processus	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94	4 minutes	1
Dénaturation	93	10 secondes	20
Hybridation	65	30 secondes	
Élongation	68	14 minutes	
Dénaturation	93	10 secondes	10
Hybridation	65	30 secondes	
Élongation	68	14 minutes + 20 secondes/cycle	
Élongation finale	68	10 minutes	1

Les produits de PCR sont stockés à 4°C jusqu'à utilisation ou congelés à -80°C en cas de conservation pour une longue durée.

3-6-2- Migration sur gel d'agarose :

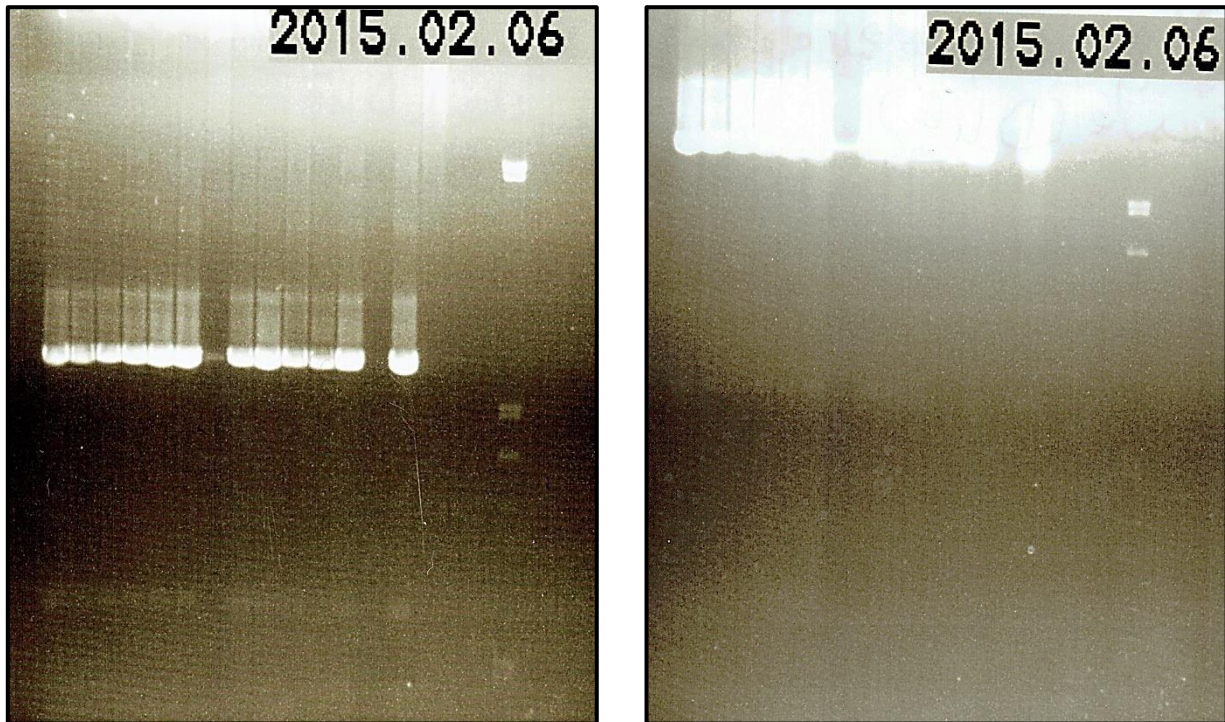
Pour apprécier la qualité de l'amplification de l'ADNmt et vérifier la présence d'éventuelles délétions, on lance une migration des produits de PCR sur gel d'agarose.

La migration des produits de PCR colorés au BBP (dilué au ½ dans le TBE1X) se fait sur un gel d'agarose (SaeKem®) à 0,6 % préparé avec du BET.

Dans chaque puits, un échantillon de 7 µl de produit de PCR auquel on ajoute 4 µl de BBP, est soumis une migration à 100V, pendant 2 heures et en parallèle avec le marqueur de taille III (Marquer III - 0,12-21,2 Kbps, Roche®) (**annexe VIII**).

L'observation du profil de migration se fait en deux temps :

- (a) Après 04 heures de migration à 45V ; permet d'apprécier la réussite de l'amplification.
- (b) Après 24 heures de migration à 25V ; à D25 (faible intensité) permet de visualiser les grosses délétions et à D50 (forte intensité) permet de visualiser les petites délétions (voir photographies ci-après).



Photographies 3 et 4 : Profils électrophorétiques d’amplicons de l’ADNmt obtenus par PCR longue.

Profils de migration à 25 V après 24 heures des amplicons XL1/XL2 (a) et OF/BR (b) appartenant à des témoins ne portant pas de délétions de l’ADNmt (vérifié par séquençage) (archive plateforme biologie moléculaire APHP Kremlin-Bicêtre).

3-7- PCR quantitative en temps réel de l’ADNmt vs ADN nucléaire :

La PCR quantitative en temps réel est une variante de la PCR classique qui combine l’amplification avec la détection et la quantification d’un signal fluorescent (Higuchi *et al.*, 1992 ; Higuchi *et al.*, 1993). Elle permet de suivre en continu, “ en temps réel », le processus d’amplification en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo-formés. Cela est rendu possible grâce à l'utilisation d'un fluorochrome particulier, le SYBR Green® (le principe de la technique de la RT-qPCR avec le SYBR Green® est mentionné dans l’annexe XIII).

La réaction de PCR se fait sur un thermocycleur particulier ; le Taqman® 7900 (Applied Biosystems®) muni d’un système d’analyse de la fluorescence et relié à un ordinateur équipé d’un logiciel d’analyse (Applied Biosystems® 7900HT Fast Real-Time PCR System).

Pour quantifier l’ADNmt par rapport à l’ADN génomique nous avons choisi deux séquences géniques connues (séquences de référence) : *ATP Synthase β* du génome nucléaire et *ND2* (OMIM : 516001) (ou *16S* (OMIM : 561010)) du génome mitochondrial.

Les caractéristiques des amorces utilisées pour cette réaction de PCR sont mentionnées dans le tableau 18.

Tableau 18 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR quantitative.

Amorce	Séquence (5'→3')	Nucléotide de départ	Taille de la région amplifiée (pb)
<i>ATP Synthase β</i> (F)	CTGACTGTGGCTGAATACTT	964	195
<i>ATP Synthase β</i> (R)	CCCTTCTTGGTAGTGGTAAT	1160	
<i>ND2</i> (F)	ATAGCCCCCATCTCAATCATA	4791	325
<i>ND2</i> (R)	GAATGCGGTAGTAGTTAGGAT	5117	
<i>16S</i> (F)	CCAATTAAGAAAGCGTTCAAG	2189	231
<i>16S</i> (R)	CATGCCTGTGTTGGGTTGACA	2420	

Solution d'amorces préparée par une dilution au 1/10^{ième} à partir de la solution mère : 20 µl (F) + 20 µl (R) + 360 µl d'eau bi-distillée.

Il s'agit d'une quantification relative ; un rapport est établi à la fin de la réaction en comparaison avec une gamme d'étalonnage (blanc et des concentrations d'ADN variables dans les deux milieux réactionnels).

Les réactifs utilisés pour la préparation du milieu réactionnel de la PCR ainsi que les quantités nécessaires pour chaque tube sont mentionnées dans le tableau 19.

La préparation du milieu réactionnel de la PCR se fait à température ambiante.

Tableau 19 : Composition du milieu réactionnel de la PCR quantitative.

Réactif	Vol/tube (µl) (<i>ATP Synthase β</i>)	Vol/tube (µl) (<i>ND2</i> ou <i>16S</i>)
H ₂ O bi-distillée	4	4
Master Mix SYBR Green [®] contenant tampon, Taq polymérase et dNTP	10	10
Amorces <i>ATP Synthase β</i> (0,5F + 0,5R)	1	
Amorces <i>ND2</i> (ou <i>16S</i>) (0,5F + 0,5R)		1
ADN (10 ng/tube)	5	5
Total	20	20
ADN Roche [®] (200 ng/µl) (1,4310E ⁶ copies d'ADNmt et 7,3510E ⁴ copies d'ADN nucléaire)	Préparation de la gamme d'étalonnage	


Les milieux réactionnels de la PCR préparés sont distribués dans les 96 puits de la plaque de PCR. La gamme d'étalonnage (gamme standard en 5 points) est préparée à partir d'un ADN Roche® dont la concentration est de 200 ng/μl (il est utile d'en vérifier la concentration sur Nanodrop® avant utilisation) comme suit : 4 dilutions en cascade au 1/10^{ème}, 10 μl ADN dans 90 μl eau, à partir de la solution diluée au 1/20^{ème} (10 μl ADN dans 190 μl eau).

La plaque de PCR est organisée en triplets (« triplicate » en Anglais), chaque quantification (pour échantillon ou gamme d'étalonnage) est établie en 3 fois (3 puits adjacents) et pour chacun des deux gènes étudiés (deux triplets adjacents). L'organisation de la plaque est illustrée dans le tableau 20.

Tableau 20 : Organisation de la plaque (96 puits) de la PCR quantitative pour *ATP Synthase β* / *ND2* *.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	P3	P3	P3	P3	P3	P3
B	ATPE ⁵	ATPE ⁵	ATPE ⁵	ND2E ⁷	ND2E ⁷	ND2E ⁷	P4	P4	P4	P4	P4	P4
C	ATPE ⁴	ATPE ⁴	ATPE ⁴	ND2E ⁶	ND2E ⁶	ND2E ⁶	P5	P5	P5	P5	P5	P5
D	ATPE ³	ATPE ³	ATPE ³	ND2E ⁵	ND2E ⁵	ND2E ⁵	P6	P6	P6	P6	P6	P6
E	ATPE ²	ATPE ²	ATPE ²	ND2E ⁴	ND2E ⁴	ND2E ⁴	P7	P7	P7	P7	P7	P7
F	ATPE ¹	ATPE ¹	ATPE ¹	ND2E ³	ND2E ³	ND2E ³	P8	P8	P8	P8	P8	P8
G	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P9	P9	P9	P9	P9	P9
H	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P10	P10	P10	P10	P10	P10

 Milieu réactionnel pour *ATP Synthase β*.

 Milieu réactionnel pour *ND2*.

P : patient (de 1 à 10).

NTC : blanc (mix *ATP Synthase β* ou *ND2* selon la case + 5 μl d'eau bi-distillée).

E⁵ à E¹ (exposant 5 à 1) pour la gamme d'étalonnage de l'ADN nucléaire selon une concentration décroissante en 5 points.

E⁷ à E³ (exposant 7 à 3) pour la gamme d'étalonnage de l'ADNmt selon une concentration décroissante en 5 points (pour l'ADNmt on commence à partir de l'exposant 7 car on tient pour constante que la quantité d'ADN génomique est 100 fois supérieure à celle de l'ADNmt).

* pour les plaques *ATP Synthase β* / *16S*, il suffit de remplacer dans la description de la plaque et des légendes *ND2* par *16S*.

Une fois la plaque établie, couverte et soumise à centrifugation pendant 1 minute à une vitesse de 1000 tours/minute, elle est mise ensuite pour PCR/analyse dans le Taqman® après avoir chargé le programme approprié.

Tableau 21 : Programme du thermocycleur pour l'amplification Q-PCR (durée : 105 minutes).

Processus	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	10 minutes	1
Dénaturation	95	15 secondes	40
Hybridation	60	1 minute	
Dénaturation	95	15 secondes	1
Hybridation	60	15 secondes	
Dénaturation	95	15 secondes	

La fluorescence est mesurée de manière ponctuelle à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle d'amplification. Elle permet ainsi d'établir une courbe de quantification représentant la fluorescence en fonction du nombre de cycles. Afin de s'assurer de la spécificité des produits de PCR amplifiés, une courbe de fusion est réalisée après la phase d'amplification.

Elle consiste en une étape de dénaturation ponctuelle à 95°C puis une hybridation à 65°C pendant 60 secondes et enfin une étape de fusion avec élévation progressive de la température jusqu'à 95°C par incrément de 0,1°C par seconde. La fluorescence est lue en continu pendant cette dernière phase de fusion. L'établissement de la courbe de fusion (fluorescence en fonction de la température) permet de discriminer les dimères d'amorces et les produits de PCR spécifiques. Pour s'assurer de la réussite de la technique, la valeur de l'inclinaison de la pente, « slope » en Anglais, doit être comprise entre -3,2 et -3,5 (**annexe XIII**).

4- Analyse statistique :

4-1- Etude cas-témoins (polymorphismes (CAG)_n de la *POLG1*, A1298C de la *MTHFR* et T3801C du *CYP11A1*) :

Nous avons procédé à une étude transversale de type cas-témoins pour chercher à déceler une différence de distribution de quelques variants génétiques entre une population de cas (hommes infertiles), constituée d'individus diagnostiqués avec le trouble d'intérêt, et une population de témoins (supposés sains) sélectionnés dans la population générale et qui ne sont *a priori* pas porteurs du dysfonctionnement étudié.

L'objectif de cette étude était de vérifier, sur un « échantillon représentatif » de la population algérienne, des données publiées dans la littérature qui associent (ou non) les polymorphismes étudiés à un risque accru de développer une infertilité masculine.

L'analyse statistique réalisée dans le cadre de notre étude a été principalement basée sur des comparaisons de fréquences des allèles des gènes étudiés entre infertiles et témoins sains, par l'utilisation du test du χ^2 (aussi appelé test de *Pearson*) à partir du logiciel Epi-info® (version 6.0) ; logiciel de statistiques appliquées à l'épidémiologie disponible en accès et téléchargement gratuit à l'adresse : <http://www.epiconcept.fr>.

Avant toute analyse statistique, il est réalisé une évaluation de l'équilibre de *Hardy-Weinberg* (*Hardy-Weinberg* Equilibrium (HWE)) pour éviter des erreurs importantes dues à un biais de génotypage ou de sélection. Pour vérifier que notre population est en équilibre d'*Hardy-Weinberg*, nous avons utilisé le test du χ^2 standard. Cette évaluation classique du χ^2 est possible lorsque les effectifs sont supérieurs à 5. Dans le cas contraire, il est nécessaire d'utiliser le χ^2 corrigé, soit avec la correction de *Yates* (effectif inférieur à 5) soit avec la correction de *Fisher* (effectif inférieur à 3). Cela a été fait en ligne sur le site : <http://analysis.bio-x.cn/SHEsisMain.htm>.

Si le degré de significativité (*p-value*) indiqué est $< 0,05$, cela permet de conclure que notre population d'étude n'est pas en équilibre d'*Hardy-Weinberg*. Cette valeur a été déterminée pour les cohortes de témoins et d'infertiles (à la fois pris ensemble ainsi que séparément en sous-groupes AZOs, OATs et ASTs).

Les résultats du génotypage pour les polymorphismes étudiés de tous nos infertiles (sous-groupes AZOs, OATs et ASTs) et témoins recrutés pour cette étude ont été traités par Excel (Microsoft Office® 2013) (pour le calcul des fréquences génotypiques et alléliques) et comparés par le logiciel Epi-info® (version 6.0) (afin d'évaluer la signification de l'association entre le facteur de risque étudié et la susceptibilité à l'infertilité masculine avec le test χ^2 et le calcul de l'Odds Ratio (OR)) pour la signification statistique. Pour calculer l'OR nous avons établi un tableau de contingence croisé 2x2 typique :

Tableau 22 : Tableau de contingence croisé.

	Patients	Contrôles	Total
Présence du facteur de risque présumé de la pathologie	a	B	a + b
Absence du facteur de risque présumé de la pathologie	c	D	c + d
	a + c	b + d	a + b + c + d

Les OR et les intervalles de confiance (Confidence Interval (CI)) à 95 % ont été calculés en tenant compte de l'allèle à risque de chaque polymorphisme ou des génotypes contenant les allèles à risque (l'allèle ≠10 dans le cas de la *POLG1*). Ce paramètre statistique est utilisé dans les études de type cas-témoins où il permet l'appréciation de l'intensité d'une association entre un marqueur et une maladie. C'est une estimation du risque relatif dans le cas où il est impossible de mesurer les risques de la maladie chez les sujets exposés et non exposés au facteur étudié. Lors d'une étude d'association de type cas-témoins, seul l'OR peut être utilisé et non pas le risque relatif. L'OR, comme toute estimation réalisée sur un échantillon, doit être présenté avec son CI à 95 %, qui mesure la précision de l'estimation.

L'évaluation du degré de significativité (*p-value*) des différences de fréquence de chaque allèle entre infertiles et témoins correspond à la probabilité que l'écart global soit imputable seulement aux fluctuations du hasard. Lorsque la probabilité *p* est égale ou inférieure à 0,05 (5 %), il y a moins de 5 chances sur 100 que la distribution résulte du hasard. Ainsi la différence de distribution entre les populations de malades et de témoins pour un marqueur donné, est statistiquement significative et le marqueur génétique étudié, dans ce contexte, peut être considéré comme étant associé à l'infertilité masculine.

Nous avons analysé 3 effets possibles des allèles mutés (≠10 (CAG)_n pour la *POLG1*) sur notre population d'infertiles (prise dans l'ensemble et pour chaque sous-groupe) en comparaison avec nos témoins.

Tableau 23 : Formulation des différents modèles de comparaison pour l'étude de l'effet de l'allèle ≠10 (infertiles/témoins).

Effet analysé	Modèle de comparaison
Effet dominant	≠10/≠10 + ≠10/10 vs 10/10
Effet récessif	10/10 + ≠10/10 vs ≠10/≠10
Effet hétérozygote	10/10 vs ≠10/10

Cette démarche méthodologique a été appliquée aux deux autres polymorphismes étudiés (T3801C du *CYP1A1* et A1298C de la *MTHFR*).

4-2- Analyse statistique des résultats de la PCR quantitative :

Il est à noter que la quantification de l'ADNmt leucocytaire par le calcul du rapport $ND2/ATPase$ ainsi que son implication comme étiologie possible de l'infertilité masculine n'a pas été rapportée dans la bibliographie.

Nous avons soumis nos résultats à divers tests statistiques visant à analyser cette distribution et de déterminer si ce paramètre est lié à l'infertilité masculine. Cela a été fait par la comparaison de la distribution des valeurs mesurées sur une population d'hommes infertiles avec celles relevées sur la population de témoins.

Tous les tests statistiques utilisés ont été réalisés sur des macros Excel (Microsoft Office® 2010) téléchargées sur le site : <http://www.anastats.fr/outils.php>.

4-2-1- Analyse de la normalité (test de *Shapiro-wilk*) :

Après calcul des rapports $ND2/ATPase$ dans le but de quantifier l'ADNmt dans les leucocytes pour nos cohortes d'infertiles et de témoins. Nous avons analysé la distribution de ce paramètre pour voir si elle suit une loi normale (loi de *Laplace-Gauss*), le test de *Shapiro-wilk* est utilisé. Il s'agit d'un puissant test de normalité qui utilise une technique d'analyse de variance pour détecter l'écart d'un échantillon à la normalité. De manière simple, il recherche à quel point une distribution de fréquences observées correspond à la distribution de fréquences attendues. Le test de *Shapiro-Wilk* (**Shapiro et Wilk, 1965**) est sensible à la fois à l'asymétrie et à l'aplatissement.

L'hypothèse nulle du test est que les données sont normalement distribuées, et que par conséquent si la *p-value* de *W* est $< 0,05$ l'hypothèse de normalité doit être rejetée.

On utilise l'algorithme de *Royston* (**Royston, 1982**) pour calculer *W* et sa *p-value*.

Pour savoir si on doit accepter ou rejeter l'hypothèse nulle, la *p-value* est comparée au seuil alpha. Si la *p-value* est $>$ au seuil choisi (0,05), les données sont normalement distribuées et si la *p-value* est $<$ au seuil choisi, la conclusion est que la distribution n'est pas normale.

La normalité peut également être observée sur les graphiques, si la distribution est normale, les points correspondant aux valeurs mesurées sont alignés sur une ligne droite.

4-2-2- Analyse de la conformité (test de *Student*) :

Lorsqu'on étudie une variable aléatoire quantitative donnée (dans ce contexte c'est le rapport *ND2/ATPase*) notée X , on mesure ce caractère dans un échantillon d'individus de taille n tiré d'une population. Par ailleurs on a la moyenne théorique de X dans une population de référence (notre cohorte de témoins), notée μ_0 et sa variance notée σ^2 (écart type noté σ).

La question est de savoir si la moyenne de X , dans l'ensemble de la population d'où est issu notre échantillon, notée μ , est égale à cette moyenne théorique μ_0 de la population de référence (hypothèse nulle H_0 pour un test bilatéral) ou si les deux moyennes sont statistiquement différentes (hypothèse alternative H_1) ; c'est le test de conformité.

Si la *p-value* est inférieure au seuil choisi (0,05), la moyenne observée est significativement différente de la moyenne théorique.

4-2-3- Analyse de la variance (test de *Brown-Forsythe*) :

Ce test peut être envisagé, de manière plus informelle, comme une ANOVA (**Welch, 1951**) basée sur les écarts absolus des valeurs mesurées à la médiane de chaque groupe. Lorsque les écarts sont plus ou moins les mêmes dans chaque groupe, on considère que les variances intra-groupes sont homogènes.

4-2-4- Comparaisons multiples (test de *Kruskal-Wallis*) :

Pour analyser la distribution du paramètre étudié (rapport *ND2/ATPase* indiquant la quantité de l'ADNmt) pour nos cohortes (infertiles, AZOs, OATs, ASTs et témoins), nous avons utilisé le test de *Kruskal-Wallis* (**Kruskal et Wallis, 1952**). C'est un test non paramétrique à utiliser lorsqu'on est en présence de k échantillons indépendants.

Résultats
et
Discussions

I- Dosage des acides nucléiques :

Dans la perspective de procéder à diverses analyses moléculaires sur les prélèvements d'ADN extraits de notre population d'étude (infertiles et témoins), nous avons mesuré la concentration des ADN et évalué la pureté de l'ADN extrait. Ces paramètres peuvent être cautions de la réussite des techniques de biologie moléculaire réalisées, en particulier celles utilisées pour l'analyse de l'ADNmt.

Par la suite, des dilutions aux $\approx 1/5^{\text{ième}}$ dans de l'eau distillée ont été effectuées. Les concentrations ainsi que les rapports DO 260/280 et DO 260/230 ont été remesurés de nouveau sur le Nanodrop®. De la même manière, les moyennes ainsi que les écarts-types de ces trois paramètres ont été recalculés (**tableau 24**).

Tableau 24 : Résultat du dosage de l'ADN extrait ainsi que la détermination des rapports 260/280 et 260/230 pour notre population d'étude.

	Moy [C] ADN (ng/μl)	Moy 260/280	Moy 260/230
Infertiles	472,61 ± 248,98	1,83 ± 0,096	1,99 ± 0,338
Infertiles (dilutions)	103,49 ± 25,723	1,89 ± 0,089	2,01 ± 0,407
Témoins	398,46 ± 261,32	1,82 ± 0,068	2,05 ± 0,305
Témoins (dilutions)	110,11 ± 28,248	1,88 ± 0,093	2,04 ± 0,294

Ces résultats mettent en évidence la qualité de l'ADN extrait. En effet, la moyenne des rapports DO 260/280 et DO 260/230 est dans les normes avec des écarts-types assez réduits suggérant une qualité homogène pour tous nos échantillons.

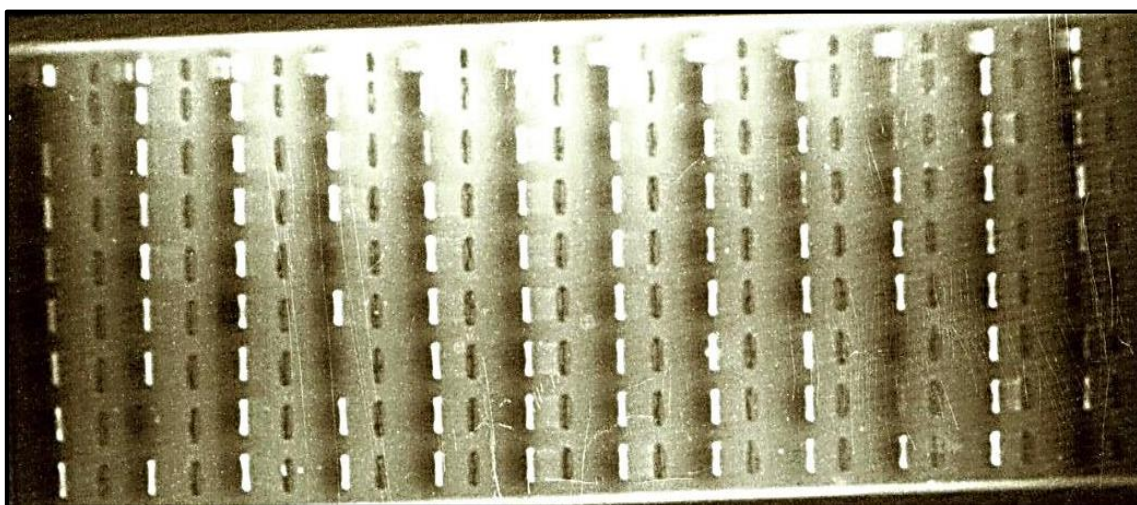
Cependant, les concentrations de l'ADN extrait sont assez fortes avec de grands écarts (écarts-types de $\pm 248,98$ chez les infertiles et de $\pm 261,32$ dans la cohorte de témoins). Cette particularité est en fait liée à la technique d'extraction de l'ADN utilisée (au NaCl).

La remesure de ces paramètres après dilutions de nos ADN aux $\approx 1/5^{\text{ième}}$ dans de l'eau distillée a été faite. La concentration des ADN est ramenée aux alentours de 100 ng/μl ($103,49 \pm 25,723$ pour les infertiles et $110,11 \pm 28,248$ pour les témoins).

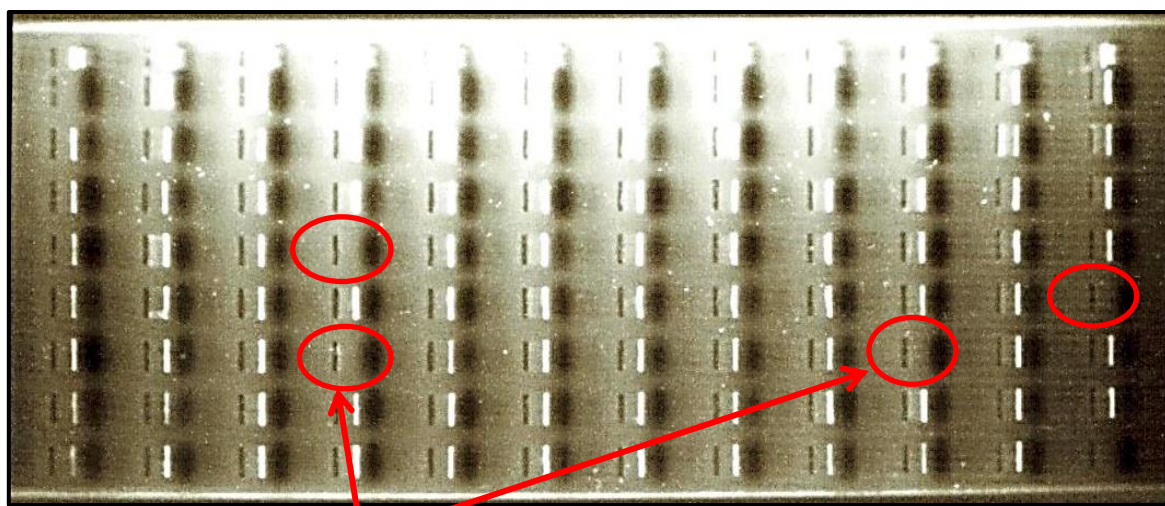
Ces dilutions ont été établies pour supprimer toute source d'erreur potentielle liée à la concentration de l'ADN utilisé, en particulier pour la PCR quantitative de l'ADNmt.

II- Génotypage de la *POLG1* ((CAG)*n*) et screening de l'exon 2 :

Dans cette étude, nous avons mené une investigation pour prospector l'implication de ce polymorphisme dans la genèse de l'infertilité masculine idiopathique en Algérie. Nous avons, en premier lieu, procéder au génotypage de la *POLG1* pour le polymorphisme de répétition CAG ainsi qu'au screening de l'exon 2. Le génotypage a été fait par séquençage de l'exon en entier pour les infertiles et les témoins. Les résultats de l'amplification de la région d'intérêt (2.1 et 2.2 pour les infertiles, 2.1 pour les témoins) sont mentionnés dans les photographies 5, 6 et 7.

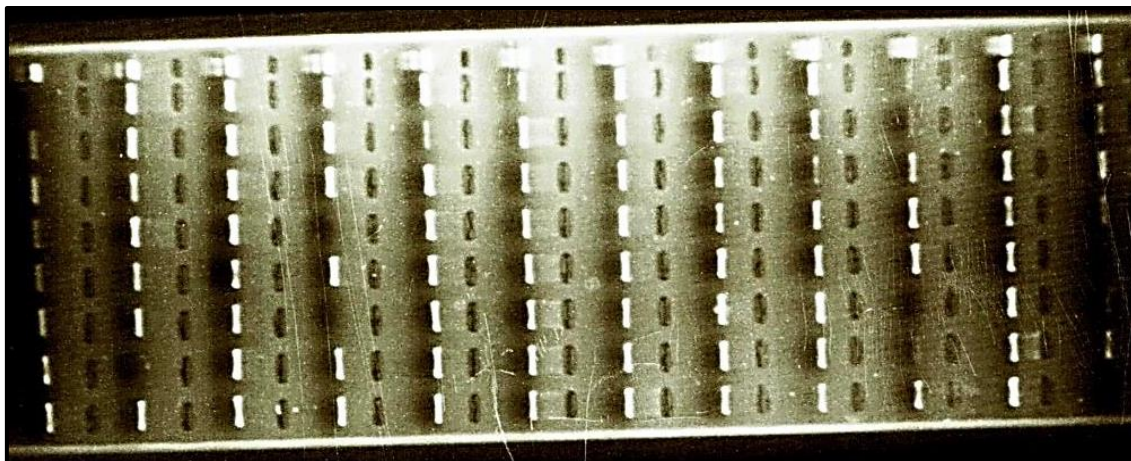


Photographie 5 : Résultats de la PCR des produits d'amplification 2.1 pour les infertiles (migration à 100 V pendant 30 minutes et en présence du marqueur V).



Absence d'amplification

Photographie 6 : Résultats de la PCR des produits d'amplification 2.2 pour les infertiles (migration à 100 V pendant 30 minutes et en présence du marqueur V).



Photographie 7 : Résultats de la PCR des produits d'amplification 2.1 pour les témoins (migration à 100 V pendant 30 minutes et en présence du marqueur V).

En parallèle de la prospection chez les infertiles et les témoins du polymorphisme (CAG)_n identifié sur l'amplicon 2.1, nous avons recherché la présence de mutations et/ou SNP sur la totalité de l'exon 2 (amplicons 2.1 et 2.2) dans la cohorte des infertiles uniquement.

La réussite de la PCR se traduit par une bande nette. La confrontation des photos des deux gels 2.1 et 2.2 permet de confirmer la réussite de l'amplification pour les deux couples d'amorces et de tirer des conclusions de l'absence de bande pour un échantillon donné. En fait, l'absence de bandes (dont certaines d'entre elles sont mises en évidence par des encadrés rouges sur la photographie 4) correspond soit à une délétion (partielle ou totale de l'exon 2) soit à un problème technique (échec de l'amplification, problème de dépôt sur gel). La vérification a été faite par une autre amplification, d'un autre gène ; l'*ATP Synthase β*, et dont la non réussite est témoin de l'absence de délétion dans la *POLG1*. Cela nous a permis d'éliminer les échantillons qui correspondent à de l'ADN dégradé.

La taille de la bande (épaisseur) est appréciée visuellement et donne une indication quantitative sur les produits de PCR obtenus par amplification. Ce paramètre déterminera, par la suite, la quantité d'eau à rajouter dans les produits de PCR après purification (de 30 à 90 μl, proportionnellement à l'épaisseur de la bande). Ce paramètre est déterminant pour la réussite de la technique de séquençage.

Le résultat du séquençage formulé en fichier (.Abi) a été analysé sur ordinateur, la lecture de ces fichiers permet de faire la distinction entre l'homozygote 10/10, l'hétérozygote 10/≠10 et l'homozygote ≠10/≠10. Les fréquences génotypiques et alléliques ont été déterminées pour les témoins et les infertiles (pris ensembles ainsi que séparément en fonction du phénotype d'infertilité) (**figures 14 et 15**).

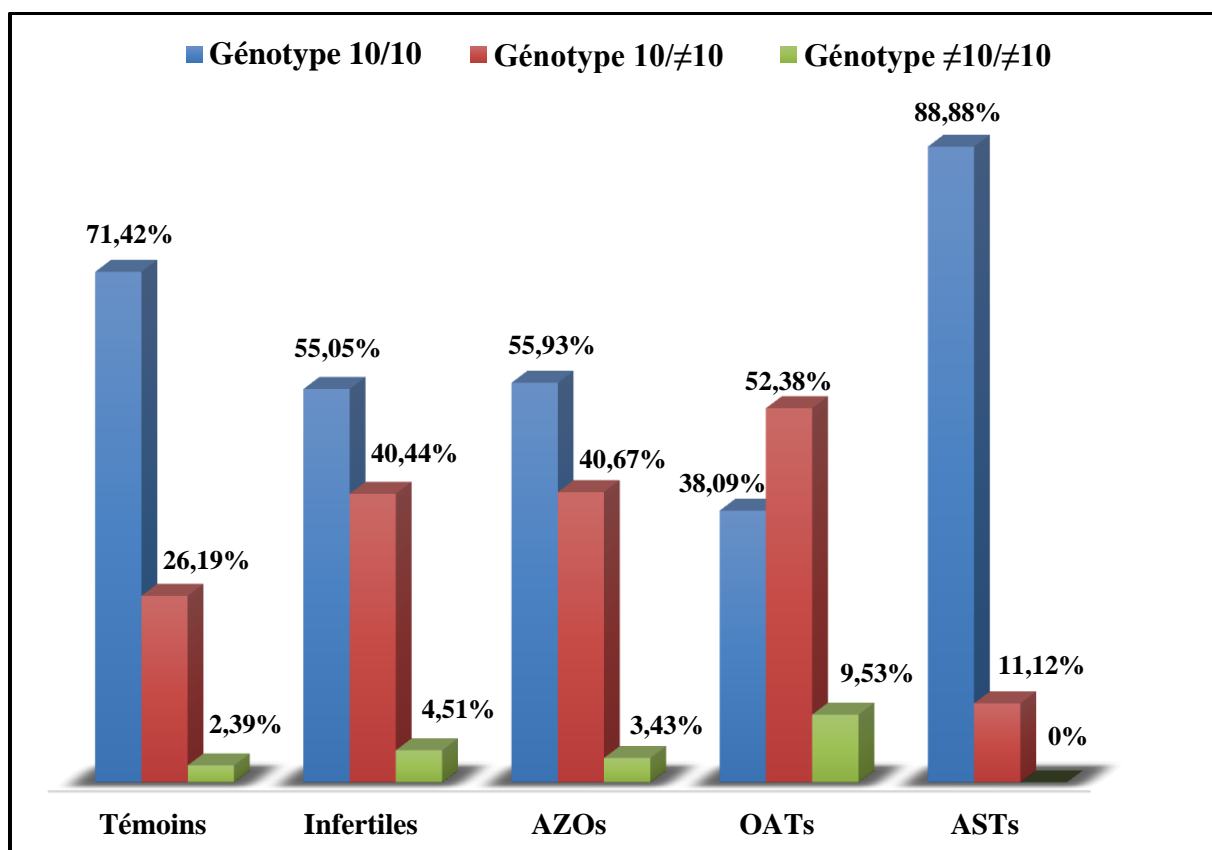


Figure 14 : Fréquences génotypiques du polymorphisme (CAG)_n de la *POLGI* (infertiles et témoins).

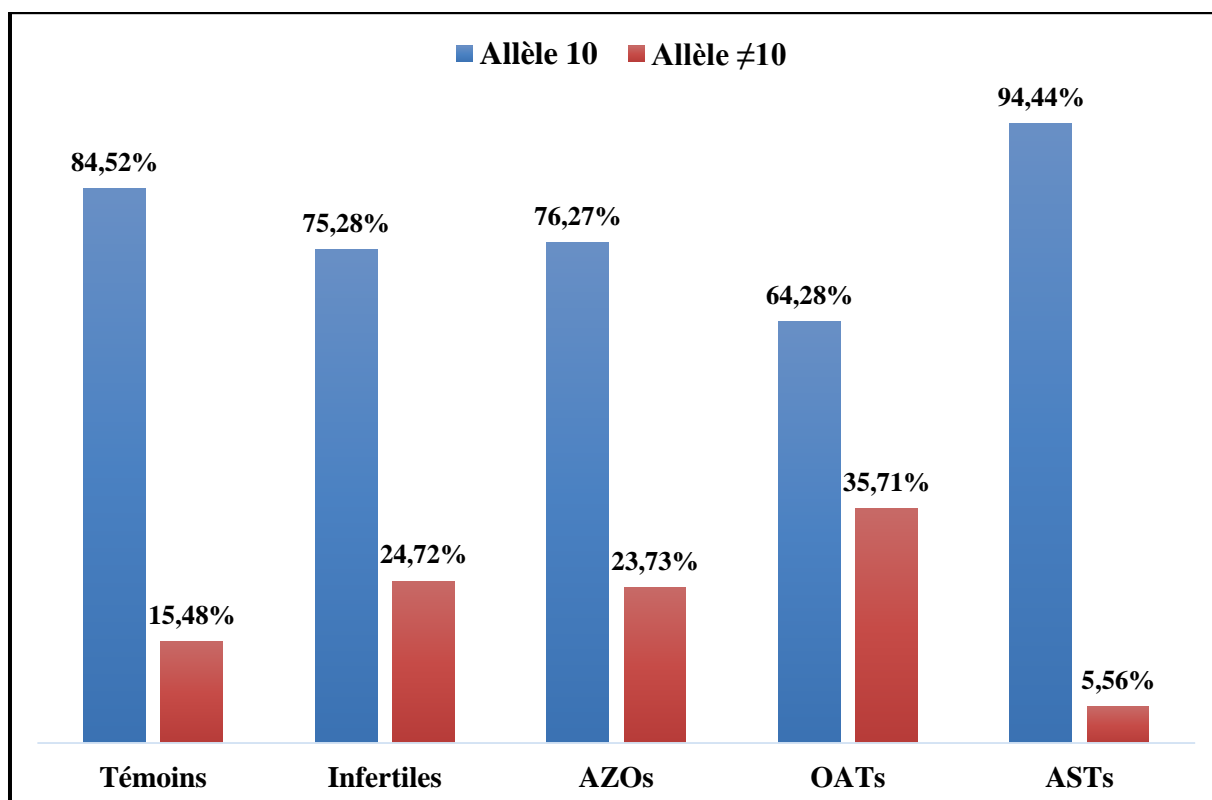


Figure 15 : Fréquences alléliques du polymorphisme (CAG)_n de la *POLGI* (infertiles et témoins).

Avant de procéder à l'analyse statistique, nous avons soumis les valeurs de la distribution des différents génotypes dans les deux cohortes au test visant à déterminer si une population d'étude est bien en HWE. Nous avons obtenu une *p-value* de **0,412** pour la cohorte des infertiles et de **0,992** pour la cohorte de témoins ; les deux *p-value* sont supérieures à 0,05 ce qui suggère que notre population est en équilibre. Nous avons déterminé également cette valeur pour les 3 sous-groupes d'infertiles ; le résultat est de **0,341** pour les AZOs, de **0,518** pour les OATs et de **0,859** pour les ASTs.

Il ressort de nos résultats que toutes nos cohortes d'infertiles (prises ensemble ou séparément en fonction du phénotype de l'infertilité) et de témoins sont bien en HWE.

L'analyse des résultats du génotypage de *POLG1* pour le polymorphisme étudié a démontré que le génotype homozygote sauvage (10/10) est le plus fréquent dans les deux cohortes avec une fréquence de 55,05 % (n = 49) chez les infertiles et de 71,42 % (n = 60) chez les témoins avec une nette prédominance dans ce dernier groupe. Le génotype hétérozygote (10/≠10) est plus fréquent chez les infertiles (40,44 %, n = 36) que chez les témoins (26,19 %, n = 22). Cette différence de distribution est statistiquement significative *p-value* = 0,03 (< 0,05). La fréquence du génotype homozygote récessif (≠10/≠10) calculée dans les deux cohortes est très faible ; respectivement 4,51 % dans le groupe des infertiles et 2,39 % dans le groupe des témoins. Cependant, cette différence de distribution est non significative *p-value* = 0,29 (> 0,05). D'autre part, et sous le modèle récessif, la différence de distribution est statistiquement significative : *p-value* = 0,02.

L'analyse des fréquences alléliques a mis en évidence une différence de répartition de l'allèle morbide (≠10) statistiquement significative entre infertiles (24,72 %) et témoins (15,48 %). En effet, nous avons obtenu une *p-value* de 0,01 (**tableau 25**).

Tableau 25 : Résultats de l'analyse statistique de l'effet du polymorphisme (CAG)_n de la *POLG1* établie par le test du χ^2 (infertiles et témoins).

	Témoins		Infertiles		OR	<i>p</i>
	%	n	%	n		
10/10	71,42	60	55,05	49	-	-
10/≠10	26,19	22	40,44	36	2,00 [00,99 - 04,05]	0,03
≠10/≠10	02,39	02	04,51	04	2,46 [00,36 - 20,21]	0,29
10/≠10 + ≠10/≠10	28,58	24	44,95	40	2,04 [01,04 - 04,03]	0,02
Allele 10	84,51	142	75,27	134	-	-
Allele ≠10	15,48	26	24,73	44	2,07 [01,07 - 04,02]	0,01

Les fréquences respectives des différents génotypes ont été comparées dans les 3 groupes d'infertiles. Le plus fréquent des génotypes est l'homozygote sauvage chez les AZOs et ASTs (respectivement de 55,93 % et 88,88 %) suivi par l'hétérozygote (respectivement de 40,67 % et 11,12 %) et l'homozygote muté (respectivement de 3,43 % et 0 %). Ces différences sont statistiquement non significatives. La fréquence de l'allèle muté, calculée pour ces mêmes sous-groupes d'infertiles, est, respectivement de 23,76 % et de 5,56 %. En comparaison avec les témoins, la différence de distribution de cet allèle dans ces deux sous-groupes n'est pas statistiquement significative.

Seul le sous-groupe des OATs montre une distribution particulière des fréquences génotypiques et alléliques pour le polymorphisme étudié. Le plus fréquent des génotypes était l'hétérozygote avec une fréquence de 52,38 % suivi par l'homozygote sauvage (38,09 %) et l'homozygote muté (9,53 %). Le calcul de l'OR et de la *p-value* (0,01) révèle une différence statistiquement significative en comparaison avec les témoins. De même, sous le modèle récessif, la *p-value* obtenue est de 0,009. En comparant les fréquences alléliques de ce sous-groupe avec la cohorte des fertiles, la différence de distribution de l'allèle morbide dans les deux populations d'étude (respectivement de 4,69 % et de 15,48 %) est statistiquement significative (**tableau 26**).

Tableau 26 : Résultats de l'analyse statistique de l'effet du polymorphisme (CAG)_n de la *POLG1* établie par le test du χ^2 (sous-groupes d'infertiles et témoins).

	10/10	10/≠10	≠10/≠10	10/≠10 + ≠10/≠10	≠10
AZOs n = 59 OR (95 % CI) <i>P</i>	55,93 % n = 33 - -	40,67 % n = 24 1,98 [00,91 - 04,33] 00,08	03,43 % n = 02 01,82 [00,17 - 19,19] 00,95	44,1 % n = 26 1,97 [00,92 - 04,21] 00,08	23,76 % n = 28 0,95 [00,45 - 02,00] NS
OATs n = 21 OR (95 % CI) <i>p</i>	38,09 % n = 08 - -	52,38 % n = 11 03,75 [01,20 - 11,96] 00,01	09,53 % n = 02 07,50 [00,63 - 91,56] 00,16	61,91 % n = 13 04,06 [01,35 - 12,46] 0,009	35,72 % n = 15 4,69 [01,60 - 14,07] 0,002
ASTs n = 9 OR (95 % CI) <i>P</i>	88,88 % n = 08 - -	11,12 % n = 01 00,34 [00,02 - 02,99] 00,53	0 % n = 00 0 [0 - 37,18] 00,54	11,12 % n = 01 0,31 [0,01 - 02,72] 00,46	05,56 % n = 01 0,29 [0,01 - 02,50] 00,41
Témoins n = 84	71,42 % n = 60	46,19 % n = 22	02,39 % n = 02	48,58 % n = 24	15,48 % n = 26

Tableau 27 : Recueil des fréquences génotypiques et alléliques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme (CAG)_n de la *POLGI*.

N°	Auteur	Pays	Infertiles						Témoins					
			Cohorte	10/10 (%)	10/≠10 (%)	≠10/≠10 (%)	10 (%)	≠10 (%)	Cohorte	10/10 (%)	10/≠10 (%)	≠10/≠10 (%)	10 (%)	≠10 (%)
1	Rovio <i>et al.</i> , 2001	Europe*	99	55,56	35,35	09,09	73,23	26,77	98	81,63	18,37	00,00	90,82	09,18
2	Martin Jensen <i>et al.</i> , 2004	Danemark	429	71,79	25,41	02,80	84,50	15,50	374	80,75	18,45	00,80	89,97	10,03
3	Krausz <i>et al.</i> , 2004	Italie	195	73,33	24,10	02,56	85,38	14,62	190	66,32	30,53	03,16	81,58	18,42
4	Aknin-Seifer <i>et al.</i> , 2005	France	433	70,90	26,10	03,00	83,95	16,05	91	72,53	26,37	01,10	85,71	14,29
5	Brusco <i>et al.</i> , 2006	Italie	277	70,40	28,16	01,44	84,48	15,52	348	68,97	26,72	04,31	82,33	17,67
6	Harris <i>et al.</i> , 2006	Nouvelle-Zélande	182	73,63	22,53	03,85	84,89	15,11	93	61,29	35,48	03,23	79,03	20,97
7	Yao <i>et al.</i> , 2006	Chine	146	93,84	06,16	00,00	96,92	03,08	104	93,27	06,73	00,00	96,63	03,37
8	Plaseski <i>et al.</i> , 2007	Macédoine	225	76,89	20,89	02,22	87,33	12,67	123	74,80	21,14	04,07	85,37	14,63
9	Amaral <i>et al.</i> , 2007	Portugal	95	72,63	27,37	00,00	86,32	13,68	40	67,50	32,50	00,00	83,75	16,25
10	Rani <i>et al.</i> , 2008	Inde	509	75,05	20,63	04,32	85,36	14,64	241	75,52	18,26	06,22	84,65	15,35
11	Shu-Yuan Liu <i>et al.</i> , 2011	Chine	150	92,67	06,00	01,33	95,67	04,33	126	94,44	05,56	00,00	97,22	02,78
12	Pongothai <i>et al.</i> , 2013	Inde	124	79,03	18,55	02,42	88,31	11,69	60	71,67	21,67	06,67	82,50	17,50
13	Baklouti-Gargouri <i>et al.</i> , 2013	Tunisie	216	84,26	11,11	04,63	89,81	10,19	123	97,56	01,63	00,81	98,37	01,63
14	La présente étude	Algérie	89	55,06	40,45	04,49	75,28	24,72	84	71,43	26,19	02,38	84,52	15,48

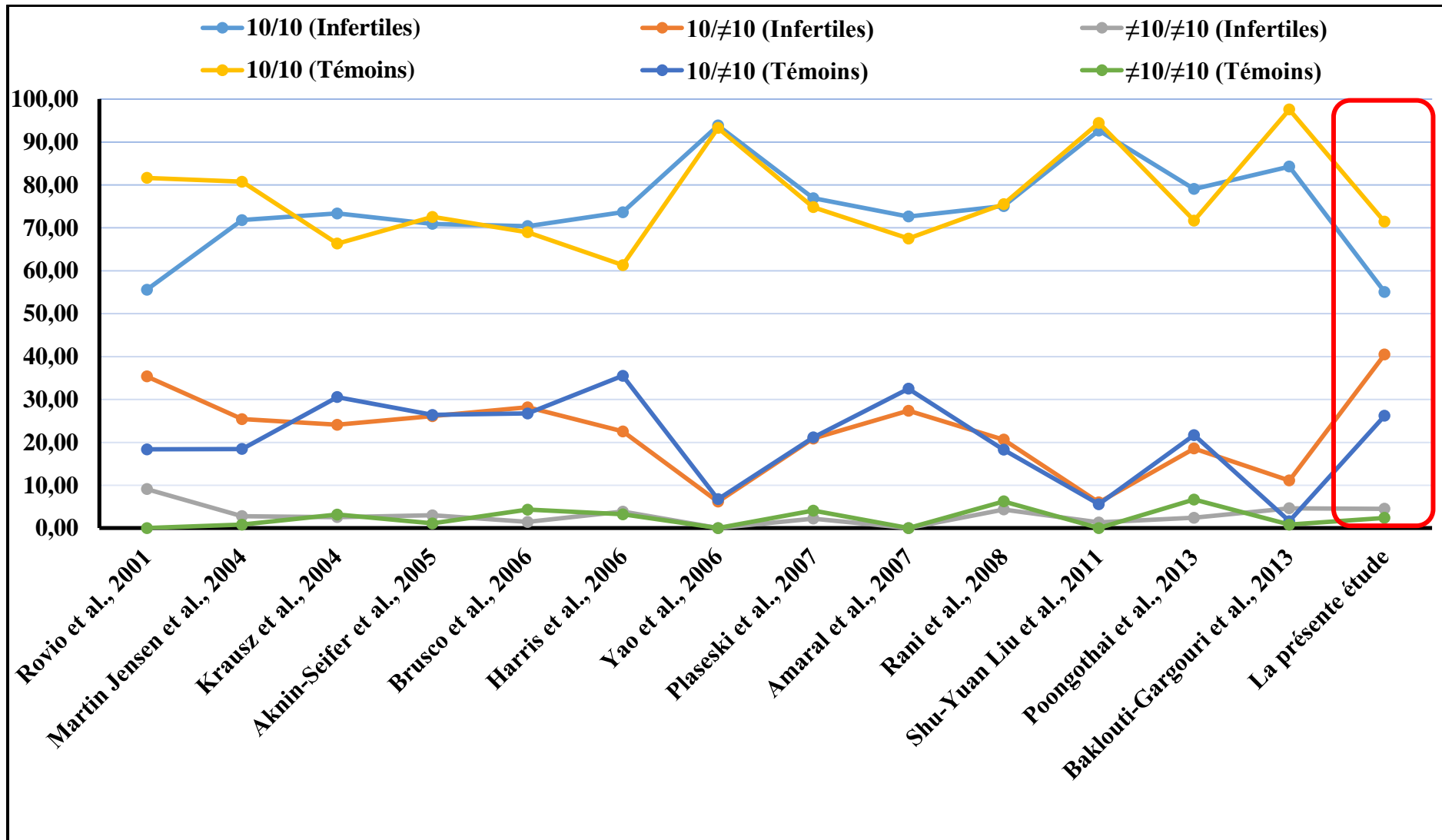


Figure 16 : Représentation graphique des fréquences génotypiques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme (CAG)_n de la *POLG1*.

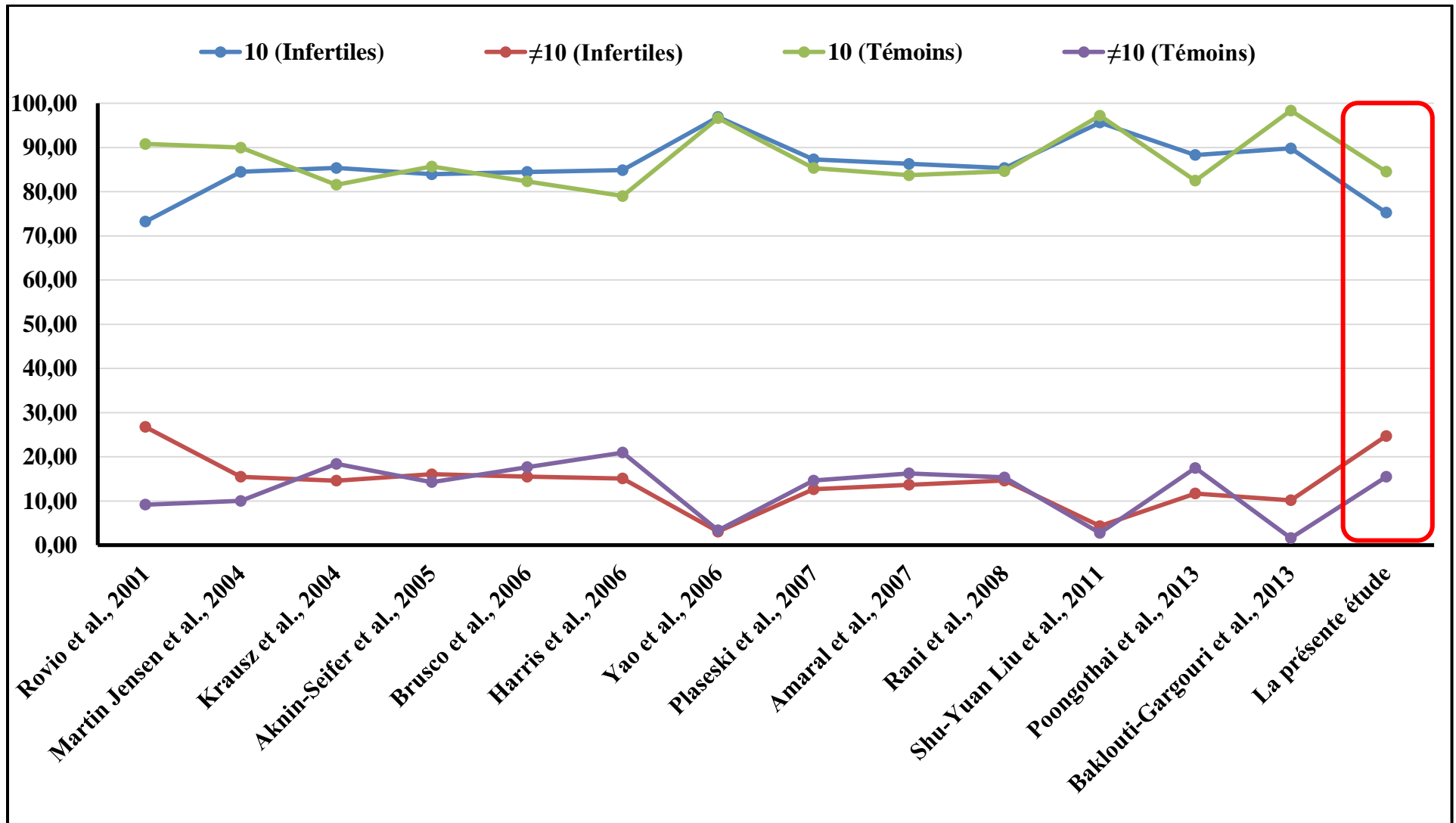


Figure 17 : Représentation graphique des fréquences alléliques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme (CAG)_n de la *POLG1*.

La variation du nombre de répétition CAG en liaison avec l'infertilité masculine a été évoquée pour la première fois par **Rovio et al (2001)** qui ont observé une association entre l'absence de l'allèle normal et l'infertilité masculine, à l'exclusion de l'azoospermie. Selon cette étude, 9 % des infertilités masculines, hormis les azoospermies et oligozoospermies extrêmes, seraient dues à cette « mutation » de *POLG1*. Une étude danoise réalisée par la suite a incriminé ce même polymorphisme dans l'infertilité inexplicée avec paramètres spermatiques normaux (**Martin Jensen et al., 2004**). Ces résultats probants sur cette association ont initié de nombreuses études construites selon le modèle cas-témoins (**tableau 27, figures 16 et 17**).

Les résultats de notre étude, la première réalisée en Algérie sur cette thématique, soutiennent l'implication du polymorphisme (CAG)_n *POLG1* dans l'infertilité masculine, mais les mécanismes moléculaires conduisant à ce dysfonctionnement restent à élucider. Les allèles mutés du *POLG1* ($\neq 10$) produiraient une enzyme répliquative dont le fonctionnement est sous-optimal entraînant l'accumulation de mutations dans l'ADNmt avec pour conséquence une altération du métabolisme énergétique des cellules germinales et finalement une perturbation de la production et/ou la différenciation des spermatozoïdes (**Harris et al., 2006**). L'identification des fonctions exactes de cette protéine et la confirmation de l'hypothèse de l'augmentation du taux de mutations de l'ADNmt en association avec le génotype de *POLG1* délétère sont attendus.

Depuis la publication des travaux de **Rovio et al** et de **Martin Jensen et al** respectivement en 2001 et 2004, plusieurs études ont rapporté une relation entre la longueur de répétition CAG du gène *PLOG1* et l'infertilité masculine (**Amaral et al., 2007 ; Baklouti-Gargouri et al., 2013**). Cependant, d'autres études n'ont pas reproduit ce résultat (**Krausz et al., 2004 ; Akinin-Seifer et al., 2005 ; Brusco et al., 2006 ; Harris et al., 2006 ; Yao et al., 2006 ; Plaseski et al., 2007 ; Westerveld et al., 2008 ; Rani et al., 2009**).

Dans notre cohorte issue de la population générale prise comme témoin de cette étude, nos résultats montrent une distribution similaire à celles rapportées dans les populations européennes et indiennes avec une fréquence élevée du génotype homozygote (10/10) chez les témoins (**Rovio et al., 2001 ; Jensen et al., 2004 ; Akinin-Seifer et al., 2005 ; Brusco et al., 2006 ; Amaral et al., 2007 ; Plaseski et al., 2007 ; Rani et al., 2009**).

Cependant, cette fréquence semble être inférieure à celles rapportées dans la population chinoise (Yao *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2011). Cela peut être expliqué par la structure génétique particulière de cette population rapportée dans plusieurs études. Cependant, et en dépit de la similitude génétique de la population algérienne et tunisienne, les fréquences du génotype 10/10 rapportées chez les témoins tunisiens étaient plus élevées que celles trouvées dans notre étude (Baklouti-Gargouri *et al.*, 2013). Cette différence de la distribution des fréquences génotypiques pourrait être liée à des origines ethniques et géographiques différentes et/ou à des biais statistiques de sélection.

Nous avons également trouvé le génotype hétérozygote (10/≠10) avec une fréquence relativement élevée chez les infertiles (40,45 %), la différence est statistiquement significative par rapport aux témoins.

Contrairement à Rovio *et al*, Amaral *et al*, Shu-Yuan Liu *et al* mais en accord avec d'autres rapports, le génotype homozygote muté n'était pas une caractéristique exclusive du groupe des infertiles, mais a également été trouvé dans le groupe des témoins. Toutefois, les fréquences du génotype homozygote muté (≠10/≠10) n'a pas été significativement plus élevée chez les hommes infertiles que chez les fertiles. La fréquence de ce génotype était similaire à celle rapportée dans des études qui ont conclu à la non implication de (CAG)_n *POLG1* dans l'infertilité masculine.

Nous observons également une différence statistiquement significative dans la distribution de l'allèle ≠10 entre les cohortes d'infertiles et de témoins. Nos résultats montrent que cet allèle de *POLG1* est délétère pour la différenciation des spermatozoïdes ou leur fonction, mais n'a pas d'effets phénotypiques évidents dans d'autres tissus. Ainsi, du fait que les spermatozoïdes sont fortement dépendants de l'énergie respiratoire pour la motilité, et le métabolisme énergétique, il a été suggéré depuis longtemps que toute perturbation de la fonction mitochondriale peut contribuer à l'infertilité. Ces défaillances mitochondriales, associées à des lésions d'ADNmt, ont été signalées dans des échantillons de sperme d'hommes infertiles par Rovio *et al* (2001), dont les résultats sont comparables aux nôtres (figure 16).

La fréquence relativement élevée des génotypes 10/≠10 et ≠10/≠10 dans notre groupe de témoins fertiles a été également rapportée dans d'autres études (Krausz *et al.*, 2004 ; Brusco *et al.*, 2006 ; Harris *et al.*, 2006 ; Plaseski *et al.*, 2007) en accord avec l'hypothèse formulée par Jensen *et al* que le polymorphisme du gène *POLG1* semble endommager la fonction des spermatozoïdes de manière discrète, sans affecter sérieusement les paramètres spermatiques (Jensen *et al.*, 2004).

La distribution des génotypes *POLG1* dans les différents sous-groupes d'infertiles montre que les génotypes 10/≠10 et ≠10/≠10 sont trouvés avec une fréquence plus élevée chez les OATs que chez les azoospermiques et asthénozoospermiques par rapport aux témoins. Ces données suggèrent que la présence de l'allèle mutant perturbe le processus spermatogénique et conduit à une qualité réduite du sperme. En 2006, **Yao et al** ont constaté que la fréquence du génotype 10/≠10 était légèrement plus élevée chez les infertiles asthénozoospermiques que chez les oligozoospermiques et azoospermiques ; ils concluent que le génotype 10/≠10 pourrait affecter la motilité des spermatozoïdes (**Yao et al., 2006**).

Nous avons également observé une faible fréquence des génotypes homozygote muté et hétérozygote pour les ASTs. Toutefois, la taille relativement réduite de ce sous-groupe d'infertiles (n = 9) ne permet pas de considérer ce résultat comme significatif.

Enfin, deux méta-analyses, publiées respectivement en 2011 (**Shu-Yuan Liu et al., 2011**) et en 2016 (**Zhang et al., 2016**) ont prospecté l'implication du polymorphisme (CAG)_n comme facteur de risque possible de l'infertilité masculine et rapportent qu'il n'y'a pas d'association. Soulignant au passage que l'étude de **Rovio et al** n'a pas été incluse dans la méta-analyse de **Shu-Yuan Liu et al** du fait que la population d'étude n'était pas en équilibre de HWE.

Enfin, nous avons démontré dans cette étude que ce polymorphisme semble être impliqué dans l'infertilité masculine en Algérie et que la présence de l'allèle muté semble corrompre la fertilité masculine, probablement par la perturbation du métabolisme énergétique de la cellule et la diminution de la mobilité spermatique.

Aujourd'hui, les altérations de la *POLG1* représentent la majorité des causes de maladies mitochondriales chez l'adulte soit environ 25 %. Elles ont été rapportées comme responsables de tableaux cliniques très différents à la fois dans l'âge de survenue et dans les symptômes associés. Cette diversité symptomatique considérable, souvent présente dans les maladies mitochondriales, complique le diagnostic à deux niveaux : d'une part, il est difficile de cerner les indications du séquençage du gène *POLG1*, d'autre part il peut être difficile d'évaluer le caractère délétère de variants de *POLG1* en l'absence de conséquences cliniques spécifiques des altérations de *POLG1* (**Lax et al., 2011**).

Toutes ces considérations ne doivent pas nous faire perdre de vue le fait que l'ADN polymérase γ est une enzyme dimérique formée d'une sous-unité catalytique codée par *POLG1* dont les mutations correspondantes ont été énumérées précédemment, mais également d'une sous-unité accessoire, régulatrice ; la *POLG2*. Il est admis que les mutations du gène *POLG2* peuvent aussi être à l'origine de défaut d'activité de la polymérase γ . La première d'entre elles a été décrite en 2006 comme étant responsable d'une PEO à transmission autosomique dominante et ptosis avec délétions multiples de l'ADNmt dans le muscle (**Longley et al., 2006**). Depuis, une dizaine d'autres ont été caractérisées (**Copeland, 2012**).

À l'instar de toutes les maladies mitochondriales, celles liées à des mutations de *POLG1* sont associées à un large spectre de symptômes impliquant de nombreux organes dont principalement le système nerveux central et périphérique et le muscle. Ces différents signes peuvent être d'ordre neurologique musculaire, sensoriel, psychiatrique, cérébro-vasculaire, gastro-intestinal, cardiaque ou endocrinien avec atteinte testiculaire (**Hudson et al., 2006**).

Malgré la large variabilité phénotypique, la combinaison des symptômes et leur progression plus que leur sévérité aide au diagnostic. À ce jour, à notre connaissance, peu de liens génotype/phénotype ont pu être bien établis (**Stumpf et al., 2013**). La coexistence de mutations dans différents domaines chez de nombreux patients complique souvent les données (**Tzoulis et al., 2006 ; Neeve et al., 2012**).

Des infertilités masculines, des cancers testiculaires ainsi que des insuffisances ovariennes ont également été rapportées mais la responsabilité de *POLG1* reste discutée (**Luoma et al., 2004 ; Saneto et al., 2010 ; Copeland, 2012**).

Enfin, il est intéressant de noter que le motif de répétition CAG de *POLG1* codant pour une polyglutamine est absent dans l'enzyme répliquative mitochondrial du rat et de la souris, alors qu'une répétition non polymorphe, plus courte, est retrouvée chez le gorille avec 6 CAG. Chez le chimpanzé, la seule espèce qui partage avec l'homme la présence de cette région à l'état polymorphe, le nombre de répétitions se situe entre 4 et 7 CAG (**Hancock et al., 2001**).

En conclusion, la signification biologique du polymorphisme de longueur de répétition CAG du gène *POLG1* dans l'infertilité masculine reste incertaine bien que le génotype hétérozygote semble être associé avec le phénotype OATs. Ce travail suggère également que la *POLG1*, éventuellement en combinaison avec d'autres facteurs génétiques, peut jouer un rôle dans la régulation du nombre de copies de l'ADNmt dans les spermatozoïdes humains.

III- Génotypage du *CYP1A1* (T3801C) :

La composante de l'environnement est incriminée en grande partie dans l'infertilité. Bien que les mécanismes biochimiques de la toxicité de ses agents exogènes ne soient pas encore bien compris. En effet, de nombreux agents présents dans notre environnement sont connus pour être nocifs. Il est frappant de constater que la résurgence du débat sur la détérioration de plusieurs paramètres de la reproduction masculine coïncide avec les préoccupations croissantes de la population sur la dégradation de l'environnement (AFSSET, 2008 ; INSERM, 2011).

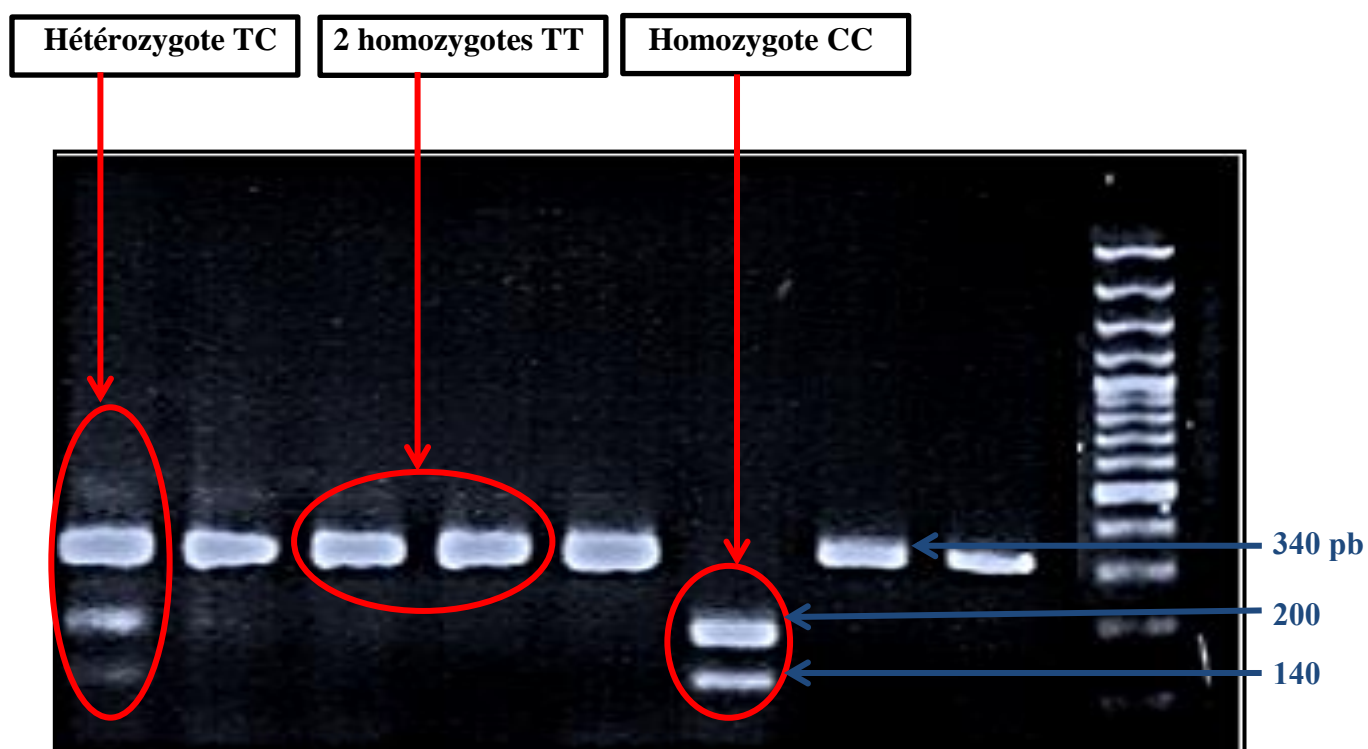
Les enzymes clés de la détoxification sont principalement les isoformes de la superfamille des cytochromes P450 qui catalysent les réactions de mono-oxygénation, de réduction, et d'hydrolyse de nombreux substrats, les rendant plus polaires, plus facilement pris en charge par les enzymes de phase II et potentiellement plus rapidement éliminés. Le processus de biotransformation peut donner lieu à des métabolites réactifs capables d'entraîner des effets génotoxiques ou immuno-toxiques (Androutsopoulos *et al.*, 2009).

Des polymorphismes du gène *CYP1A1* (cytochrome P450 extra-hépatique majeur) ont été identifiés. Ces polymorphismes, rappelons-le, confèrent une activité accrue à cette enzyme impliquée dans la biotransformation de phase I. Dans ce cas, nous pourrions nous attendre à ce que les porteurs d'un ou de deux allèles mutés voient leur risque d'infertilité augmenté suivant l'énoncé de l'hypothèse voulant que les radicaux libres soient en cause dans la physio-pathologie de l'atteinte (Kristiansen *et al.*, 2011).

Le gène *CYP1A1* code pour une enzyme qui est principalement exprimée dans le foie, mais qui a été détectée également dans les organes reproducteurs mâles, et peut activer les hydrocarbures aromatiques tels que le benzo(a)pyrène en époxydes et des produits phénoliques qui sont mutagènes et cancérigènes. Le polymorphisme *CYP1A1* T3801C peut modifier le niveau de l'expression des gènes ou la stabilité de son ARNm, conduisant à une activité hautement inductible de l'enzyme, pouvant entraîner des troubles de la reproduction masculine (Luo *et al.*, 2014). Les polymorphismes du *CYP1A1* peuvent causer des dommages à l'ADN en modifiant le niveau d'expression du gène par la stabilité de son ARNm, ce qui entraîne une activité hautement inductible de l'enzyme. *CYP1A1* T3801C (aussi appelé m1) est un polymorphisme dans la région non codante 3' du *CYP1A1*, contenant une seule substitution de T en C qui donne naissance à un site de restriction *MspI*. Le variant C a été trouvé pour être plus facilement inductible par rapport au variant T, et il est concevable que ce polymorphisme peut avoir ainsi une relation avec l'infertilité masculine.

Afin d'enquêter sur l'association possible entre le polymorphisme T3801C du *CYP11A1* et le risque de l'infertilité masculine en Algérie, nous avons effectué cette étude cas-témoins. Le génotypage du *CYP11A1* pour ce polymorphisme a été réalisé par PCR/digestion.

Après amplification partielle de la région 3' non codante du gène et digestion des amplicons par *HpaII*, le profil de restriction obtenu permet la distinction entre l'homozygote TT, l'hétérozygote TC et l'homozygote CC (**photographie 8**). Les résultats obtenus sont mentionnés dans les figures ci-après (**figures 18 et 19**).



Photographie 8 : Profil de restriction des produits de l'amplification partielle de la région 3' non codante du gène *CYP11A1* après digestion par *HpaII*.

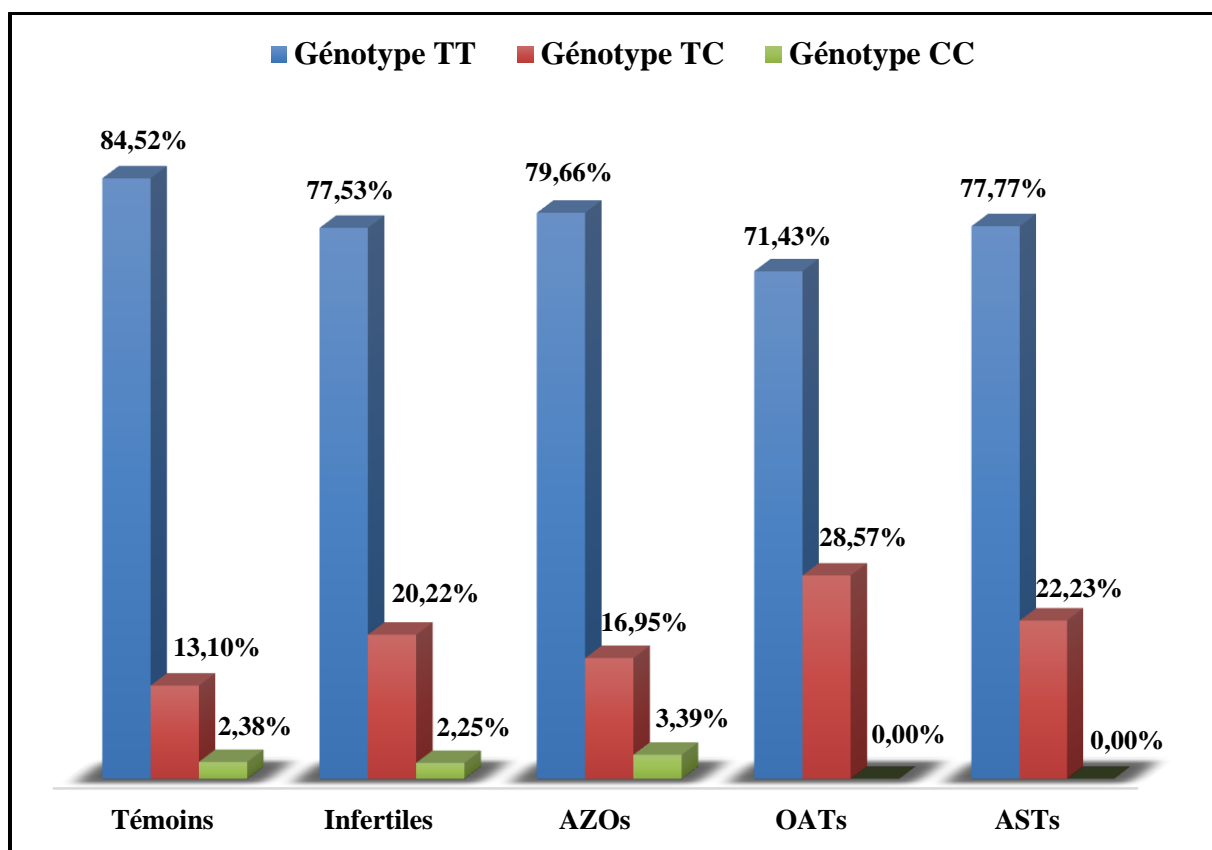


Figure 18 : Fréquences génotypiques du polymorphisme T3801C du *CYP1A1* (infertiles et témoins).

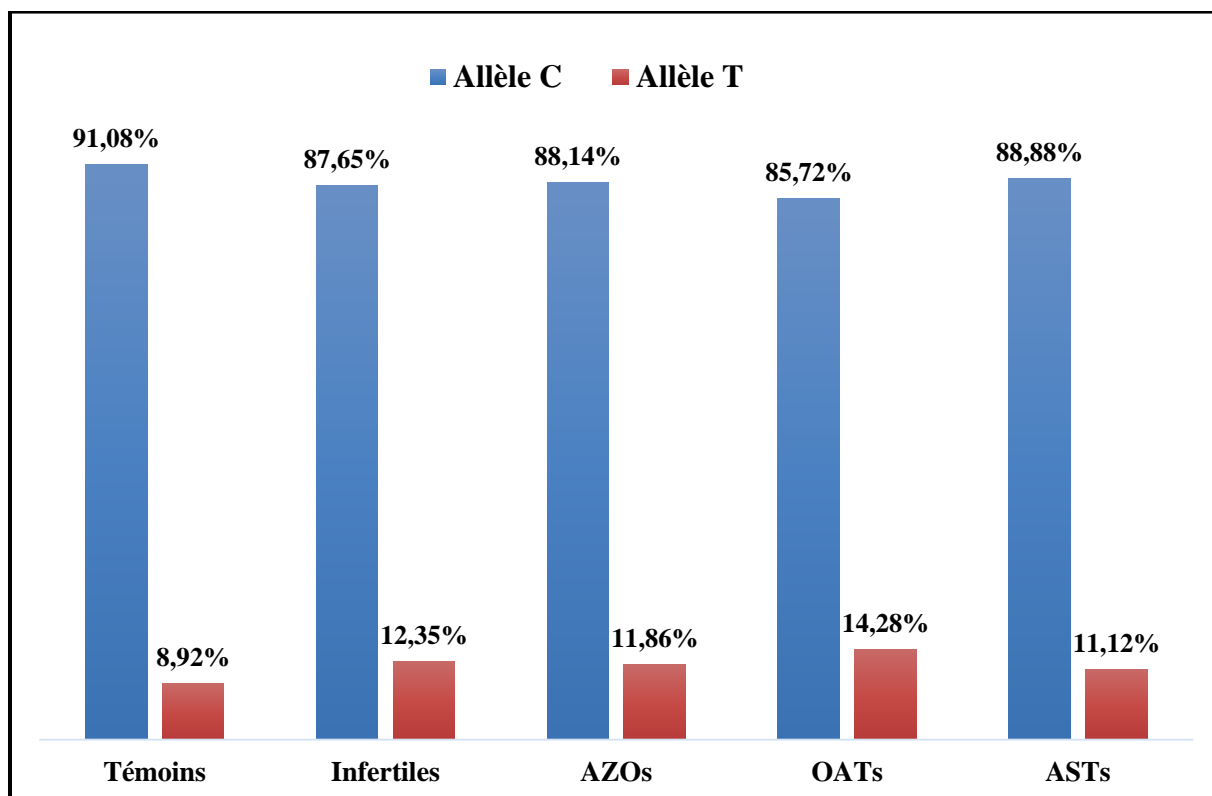


Figure 19 : Fréquences alléliques du polymorphisme T3801C du *CYP1A1* (infertiles et témoins).

Nous avons évalué la valeur de HWE de nos cohortes pour le polymorphisme étudié, et obtenu une *p-value* de **0,530** pour les infertiles, pris séparément, le résultat obtenu est de **0,145** pour les AZOs, de **0,445** pour les OATs et de **0,707** pour les ASTs, et de **0,074** pour les témoins ; toutes supérieures à 0,05 suggérant que toutes nos cohortes sont bien en HWE.

L'analyse des résultats du génotypage du *CYP11A1* pour le polymorphisme T3801C révèle une distribution des fréquences génotypiques et alléliques homogène entre infertiles et témoins. En effet, et ce dans les deux cohortes, le génotype sauvage TT est le plus fréquent (77,53 % pour les infertiles et 84,52 % pour les témoins) suivi de l'hétérozygote TC (20,22 % et 13,10 %) et enfin de l'homozygote muté CC (2,35 % et 2,38 %). De même, la fréquence de l'allèle morbide est de 12,36 % pour les infertiles et de 8,93 % pour les témoins. Après calcul de l'OR et de la *p-value*, toutes les différences de distribution génotypiques et alléliques observées ne sont pas statistiquement significatives (**tableau 28**).

Tableau 28 : Résultats de l'analyse statistique du polymorphisme T3801C du *CYP11A1* établie par le test du χ^2 (infertiles et témoins).

	Témoins		Infertiles		OR	P
	%	n	%	n		
TT	84,52	71	77,53	69	-	-
TC	13,10	11	20,22	18	1,68 [0,69 - 4,14]	0,29
CC	02,38	02	02,35	02	1,03 [0,10 - 10,58]	0,63
TC + CC	15,48	13	22,47	20	1,58 [0,69 - 3,69]	0,32
Allele T	91,07	153	87,64	156	-	-
Allele C	08,93	15	12,36	22	1,44 [0,68 - 3,04]	0,39

L'analyse des résultats du génotypage du *CYP11A1* pour le polymorphisme T3801C démontre, et ce dans les trois sous-groupes d'infertiles, que le génotype TT est le plus fréquent (79,66 % chez les AZOs, 71,43 % chez les OATs et 77,78 % chez les ASTs) suivi respectivement de TC (16,95 % chez les AZOs, 28,57 % chez les OATs et 22,22 % chez les ASTs) et de CC (03,39 % chez les AZOs, 0 % chez les OATs et les ASTs).

Cependant, la fréquence de l'allèle C est assez homogène pour les 3 sous-groupes d'infertiles : 11,86 % chez les AZOs, 14,29 % chez les OATs et 11,11 % chez les ASTs, mais plus importante que celles observées dans la cohorte de témoins (8,93 %). La prospection de l'hétérogénéité des fréquences rapportées dans ces différents groupes d'études par le calcul de l'OR et de la *p-value* (de 0,54, 0,45 et 0,90 respectivement pour les AZOs, OATs et ASTs ; toutes supérieures à 0,05) nous a permis de conclure que ce polymorphisme ne constitue pas un facteur de risque de l'infertilité masculine dans notre population (**tableau 29**).

Tableau 29 : Résultats de l'analyse statistique du polymorphisme T3801C du *CYP11A1* établie par le test du χ^2 (sous-groupes d'infertiles et témoins).

	TT	TC	CC	TC + CC	C
AZOs n = 59 OR (95 % CI) <i>p</i>	79,66 % n = 47	16,95 % n = 10 1,37 [0,49 - 3,83] 0,66	03,39 % n = 02 1,51 [0,15 - 15,68] 0,91	20,34 % n = 12 1,39 [0,54 - 3,60] 0,59	11,86 % n = 14 1,37 [0,60 - 3,16] 0,54
OATs n = 21 OR (95 % CI) <i>p</i>	71,43 % n = 15 - -	28,57 % n = 06 2,58 [0,71 - 9,22] 0,18	00 % n = 00 0 [0 - 21,43] 0,76	28,57 % n = 06 0,62 [0,62 - 7,55] 0,28	14,29 % n = 06 1,70 [0,54 - 5,11] 0,45
ASTs n = 09 OR (95 % CI) <i>p</i>	77,78 % n = 07 - -	22,22 % n = 02 1,84 [0,23 - 11,91] 0,83	00 % n = 00 0 [0 - 51,53] 0,41	22,22 % n = 02 1,56 [0,20 - 9,80] 0,96	11,11 % n = 02 1,27 [0 - 6,69] 0,90
Témoins n = 84	84,52 % n = 71	13,10 % n = 11	02,38 % n = 02	15,48 % n = 13	8,93 % n = 15

Nos résultats démontrent que l'allèle m1 n'est pas un facteur de risque de l'infertilité masculine pour tous les modèles génétiques étudiés (modèle codominants ou effet hétérozygote : TC vs TT, modèle dominant : TC + CC vs TT). L'analyse distincte entre les sous-groupes de sujets infertiles avec AZOs, OATs et ASTs révèle les mêmes résultats et convergent vers la même conclusion.

Nous avons étudié ce polymorphisme comme facteur de risque potentiel de ce dysfonctionnement pour la première fois en Algérie. Des études menées dans diverses populations ont essayé d'évaluer le rôle de ce polymorphisme dans l'infertilité masculine idiopathique (**Luo et al., 2014**). Les détails relatives aux études publiés sur cette problématique sont exposés ci-après (**tableau 30, figures 20 et 21**).

Tableau 30 : Recueil des fréquences génotypiques et alléliques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme T3801C du *CYP11A1*.

N°	Auteur	Pays	Infertiles						Témoins					
			Cohorte	TT (%)	TC (%)	CC (%)	T (%)	C (%)	Cohorte	TT (%)	TC (%)	CC (%)	T (%)	C (%)
1	Lu N <i>et al.</i> , 2008	Chine	192	35,94	50,00	14,06	60,94	39,06	226	42,04	46,02	11,95	65,04	34,96
2	Aydos SE <i>et al.</i> , 2008	Turquie	110	70,91	27,27	01,82	84,55	15,45	105	90,48	09,52	00,00	95,24	04,76
3	Vani GT <i>et al.</i> , 2009	Inde	206	52,43	38,83	08,74	71,84	28,16	230	63,48	34,78	01,74	80,87	19,13
4	Chen WC <i>et al.</i> , 2010	Chine	105	33,33	44,76	21,90	55,71	44,29	140	62,86	32,14	05,00	78,93	21,07
5	Peng L <i>et al.</i> , 2012	Chine	204	35,29	45,59	19,12	58,09	41,91	202	38,61	46,53	14,85	61,88	38,12
6	Salehi S <i>et al.</i> , 2012	Iran	150	38,67	48,00	13,33	62,67	37,33	200	42,50	45,50	12,00	65,25	34,75
7	Yarosh SI <i>et al.</i> , 2013	Russie	203	81,28	17,24	01,48	89,90	10,10	227	77,53	21,15	01,32	88,11	11,89
8	La présente étude	Algérie	89	77,53	20,22	02,25	87,64	12,36	84	84,52	13,10	02,38	91,07	08,93

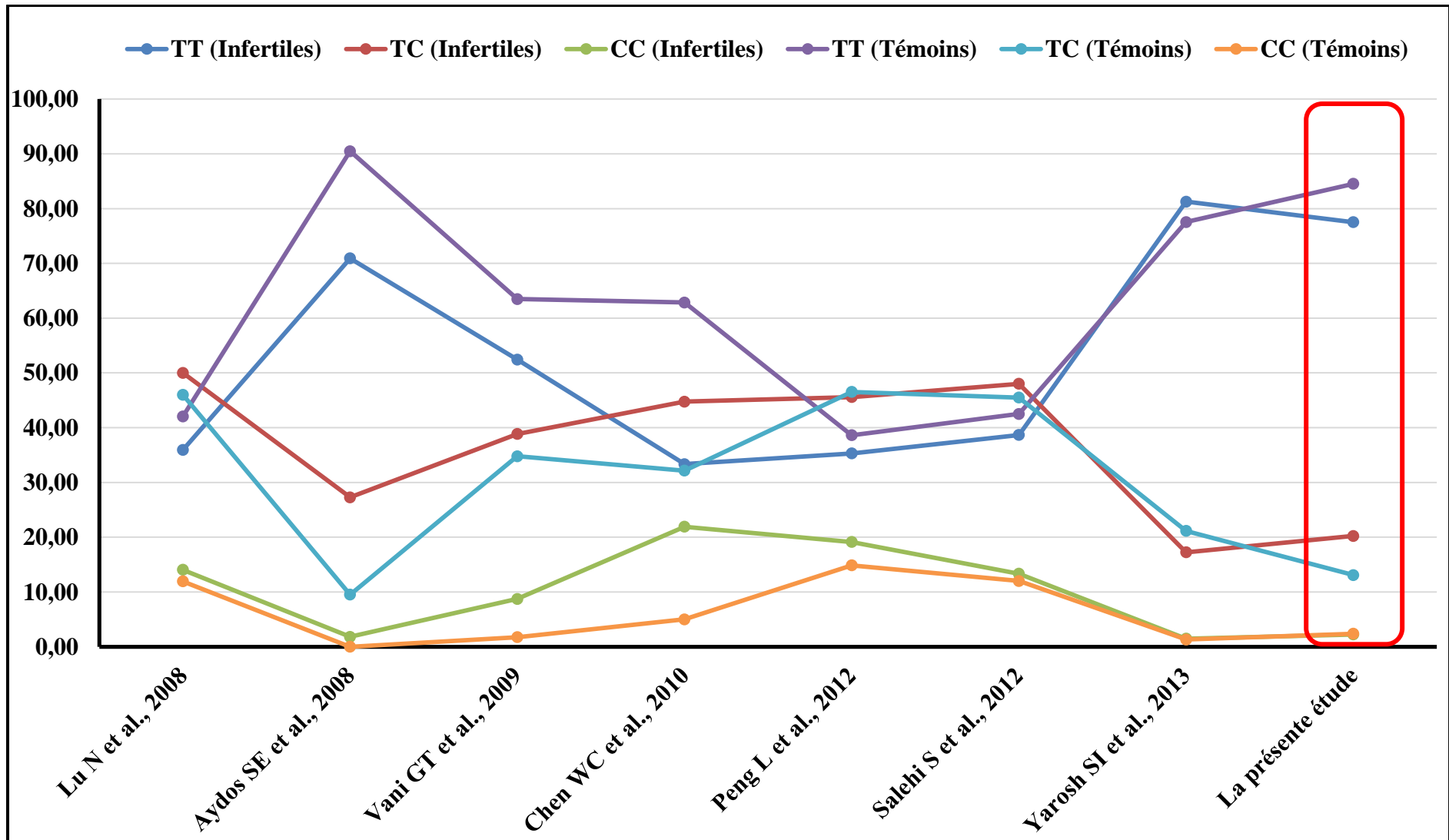


Figure 20 : Représentation graphique des fréquences génotypiques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme T3801C du *CYP11A1*.

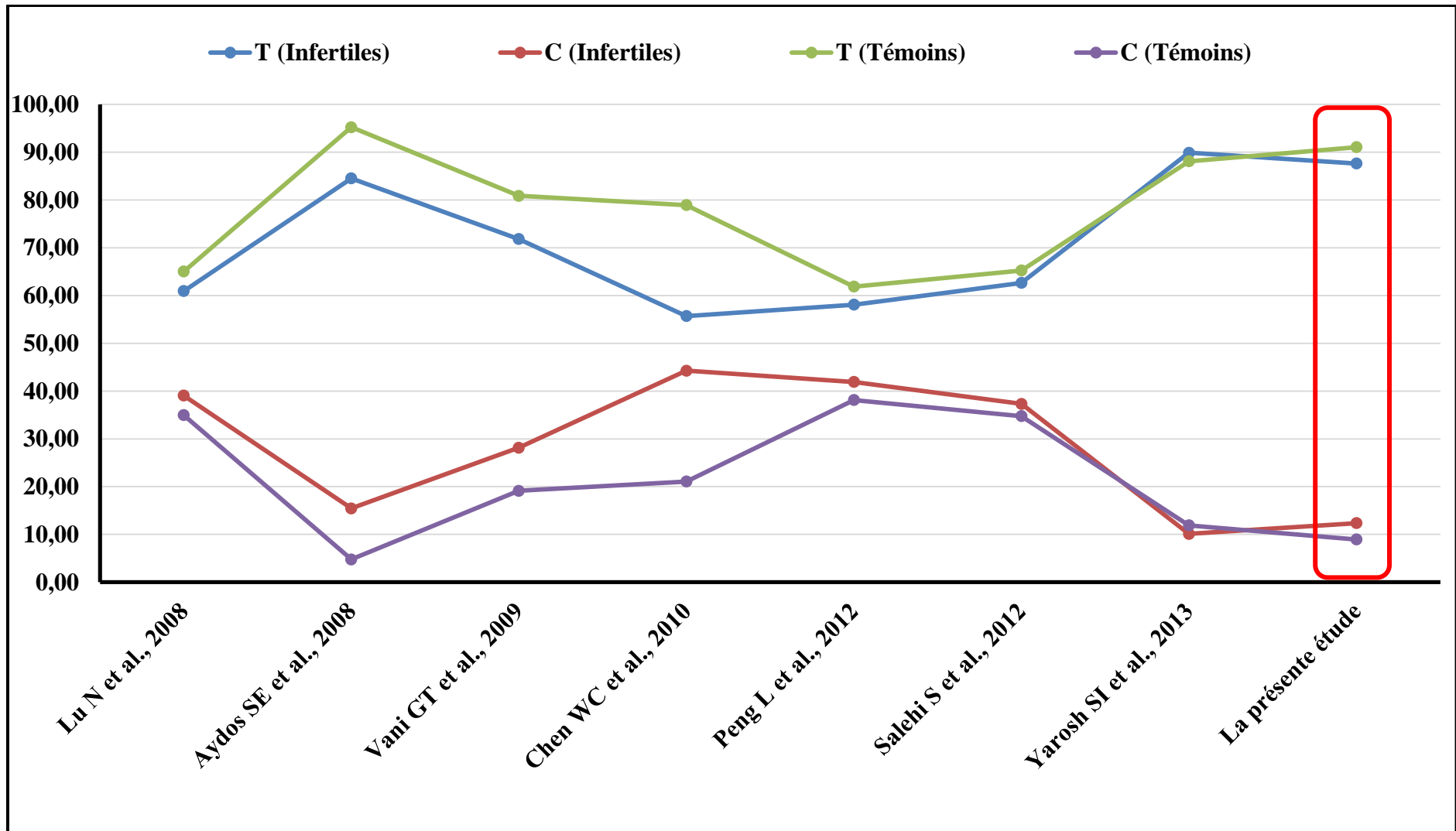


Figure 21 : Représentation graphique des fréquences alléliques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme T3801C du *CYP11A1*.

La première étude avec des données exploitables pour une possible comparaison des résultats a été publiée en 2007 et rapporte qu'aucune association significative n'existe entre le polymorphisme m1 et l'infertilité masculine, cependant, le polymorphisme m2 (A2455G) semble contribuer à la genèse de l'infertilité masculine dans la population chinoise (**Lu et al., 2007**). Des études sur les populations iraniennes ont montré que le T3801C du *CYP11A1* n'a pas fait preuve d'association avec l'infertilité masculine (**Salehi et al., 2012**). Dans l'année qui a suivi, une étude menée sur un échantillon de la population russe montre que les polymorphismes du *CYP11A1* n'ont aucun effet sur la susceptibilité génétique à ce dysfonctionnement (**Yarosh et al., 2013**).

Nos résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par les Indiens qui ont montré des différences de caractéristiques spermatiques entre les trois génotypes TT, TC, et CC des hommes infertiles et fertiles (contrôles); ces différences ont été jugées significatives, sauf pour le volume de sperme et le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat chez les sujets infertiles et témoins (**Vani et al., 2012**).

En outre, deux méta-analyses réalisées par des équipes chinoises respectivement en 2013 et en 2014 ont montré que le polymorphisme T3801C est associé à un risque accru d'infertilité masculine chez les asiatiques, mais pas chez les Caucasiens (**Fang et al., 2013**) et fourni la preuve d'une association significative entre le polymorphisme T3801C et le risque de l'infertilité masculine idiopathique (**Luo et al., 2014**). Les résultats contradictoires de ces deux méta-analyses quant à l'association chez les Caucasiens pourraient être dues à de nombreux facteurs, y compris les diverses procédures de recrutement des populations.

Une autre étude réalisée celle-ci sur l'impact de la consommation du tabac combinée avec les polymorphismes Ile462Val et T3801C sur la susceptibilité à l'infertilité masculine idiopathique démontre que l'analyse des interactions gènes-environnement est nécessaire pour expliquer, en partie, les résultats contradictoires des études génétiques (**Yarosh et al., 2013**).

L'absence d'association dans notre étude peut découler de la taille relativement restreinte de l'échantillon étudié comme elle peut indiquer que notre région (Nord Algérien) est hautement conservée comparativement à d'autres régions dans le monde (**Vani et al., 2012**). Plus important encore, les effets génétiques de faible pénétrance du polymorphisme d'intérêt peuvent dépendre en grande partie de l'interaction avec d'autres polymorphismes et/ou d'une exposition environnementale particulière, y compris les facteurs diététiques et environnementaux liés à des professions et/ou des habitats particuliers. Il faut prendre en considération que, à l'heure actuelle, l'Algérie n'est pas un pays où la pollution industrielle peut être considérée comme facteur de risque prépondérant.

Depuis l'identification des polymorphismes du *CYP1A1*, de nombreuses études ont prospecté son implication dans la pathogenèse de nombreuses maladies. Les premières d'entre-elles sont les pathologies cancéreuses (**Adala et al., 2011**). La première étude d'association du polymorphisme m1 avec l'infertilité masculine a été réalisée en 1998 (**Fritsche et al., 1998**).

Les mécanismes biologiques par lesquels la variation d'activité du *CYP1A1* exerce ses effets sur la genèse de l'infertilité masculine ne sont pas clairement élucidés. L'enzyme CYP1A1 joue un rôle essentiel dans le métabolisme de phase I de HAP et dans le métabolisme des œstrogènes, la dysfonction du CYP1A1 peut causer des dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines (**Adala et al., 2011**).

À partir d'un modèle animal, la toxicité des HAP sur les cellules germinales qui subissent une division méiotique a été démontrée *in vitro*, les auteurs de cette étude ont suggéré que des concentrations faibles d'HAP inhibent la division méiotique ; mais sa forte concentration provoque une cytotoxicité (**Georgellis et al., 1990**).

Des expériences effectuées *in vivo* ont démontré que les métabolites mutagènes du Benzo(a)pyrène tels que le Benzo(a)Pyrène Diol Époxyde (BPDE) générés par l'induction de l'enzyme CYP1A1 pourrait être en partie responsable de la mort des cellules dans les testicules. En effet, ce composé s'intercale au niveau de l'ADN dans les noyaux des spermatocytes apoptotiques. Une possibilité est que ces cellules soient ciblées par ce processus de mort programmé en raison des dommages irréparables, plus particulièrement l'altération de l'ADN qu'elles ont subi. En plus des dommages de l'ADN nucléaire, ces mêmes chercheurs ont remarqué une coloration réactionnelle au BPDE dans le cytoplasme, ce qui pourrait indiquer que l'ADNmt est également endommagé (**Esakky et al., 2012**).

D'autres chercheurs ont démontré que les expositions élevées aux Dichloro-Diphényle-Trichloro-éthane (DDT) qui possède des propriétés insecticides à large spectre et son métabolite le Dichloro-Diphényle-dichloro-Éthylène (DDE) affectent de manière défavorable les 3 paramètres spermatiques (concentration, motilité et morphologie) ; leurs effets biologiques ont été exacerbés par la présence d'un ou de plusieurs variants communs (m1, m2, m3 et/ou m4) du gène *CYP1A1* (**Messaros et al., 2009**).

IV- Génotypage de la *MTHFR* (A1298C) :

L'élévation du taux d'homocystéine, un déficit en folates, par carence d'apport alimentaire ou en rapport avec une ou plusieurs défaillances enzymatiques, se traduit par : une diminution de la synthèse de l'ADN et de sa réparation, par une hypométhylation globale au niveau du génome, ainsi que par une accumulation d'homocystéine (**Gupta *et al.*, 2013**). Ainsi, il a été démontré qu'une inhibition de la synthèse des acides nucléiques est susceptible d'avoir des effets délétères sur des cellules à fort potentiel mitotique, telles que les spermatogonies (**Lawrence de Koning *et al.*, 2003**).

Un dysfonctionnement dans ce métabolisme serait impliqué dans la pathogenèse de nombreuses maladies. Les premières études se sont focalisées sur l'hyper-homocystéinémie qui peut résulter de ce déficit : son implication dans un nombre croissant de pathologies, en particulier cardiovasculaires et neuro-dégénératives, mais aussi dans certaines malformations congénitales et complications de la grossesse a été démontrée. Le rôle potentiel de ce métabolisme dans la reproduction (gamétogenèse, fécondation et développement embryonnaire) n'ont été prospecté que tardivement (**Singh *et al.*, 2005**).

De nombreux travaux ; études d'association de type cas-témoins, l'utilisation de modèles cellulaires et animaux suggèrent l'implication des folates dans l'infertilité masculine. Cependant, les mécanismes biochimiques et moléculaires selon lesquels une carence en folate et l'hyper-homocystéinémie qui en résulte pourraient perturber la fertilité masculine ne sont pas connus avec certitude. En effet, il a été constaté que la concentration des folates dans le plasma séminal est corrélée avec celle du plasma sanguin tout en étant environ une fois et demie supérieure (**Boxmeer *et al.*, 2007 ; Forges *et al.*, 2008**).

Le gène *MTHFR* présente des polymorphismes parmi lesquels deux, les plus communs, C677T et A1298C, ont été associés à une diminution de son activité et sont d'une importance clinique particulière. La place qu'occupe cette enzyme dans le métabolisme des folates ne doit pas nous faire perdre de vue que d'autres enzymes tels que la MTR et la MTRR dévolues à ce métabolisme présentent également des variations.

Cependant, la signification de celles-ci reste moins bien documentée (**Laraqui *et al.*, 2006**).

Le génotypage de la *MTHFR* pour le polymorphisme A1298C a été fait par PCR/digestion. Après amplification partielle de l'exon 7 et digestion des amplicons par *Mbo*II, le profil de restriction obtenu permet la distinction entre l'homozygote AA, l'hétérozygote AC et l'homozygote CC (**voir photographies ci-après**). À partir des résultats ainsi obtenus, les fréquences génotypiques et alléliques ont été calculées (**figures 22 et 23**).



Photographies 9 et 10 : Profil de restriction des produits de l'amplification partielle de l'exon 7 du gène de la *MTHFR* après digestion par *MboII*.

De même que pour les polymorphismes prospectés précédemment, nous avons procédé pour l'A1298C de la *MTHFR* au test visant à déterminer si notre population est en HWE.

Nous avons obtenu une *p-value* de **0,194** pour la cohorte des infertiles et de **0,009** pour la cohorte de témoins ; la *p-value* pour les témoins était inférieure à 0,05 ce qui suggère que cette cohorte n'est pas en HWE pour le polymorphisme étudié. Les résultats obtenus pour les 3 sous-groupes d'infertiles étaient de **0,123** pour les AZOs, de **0,512** pour les OATs et de **0,391** pour les ASTs. Ces résultats confirment que toutes nos cohortes d'infertiles (pris ensemble ou séparément en fonction du phénotype de l'infertilité) sont bien en HWE.

L'analyse des résultats du génotypage de la *MTHFR* pour le polymorphisme A1298C révèle une différence dans la distribution des génotypes entre infertiles et témoins. Dans la cohorte des infertiles, le génotype homozygote sauvage (AA) est le plus fréquent (59,55 %, n = 53), suivi de l'hétérozygote (AC) (38,20 %, n = 34) et de l'homozygote muté (CC) (2,25 %, n = 02). Cependant, dans la cohorte des témoins, le génotype AC est le plus fréquent (54,76 %, n = 46), suivi des génotypes AA (41,67 %, n = 35) et CC (3,57 %, n = 3). L'analyse de la distribution des fréquences génotypiques entre infertiles et témoins a montré une certaine hétérogénéité mais qui, cependant, n'est pas statistiquement significative. En effet, le calcul de la *p-value* indique des valeurs de 0,29 pour l'hétérozygote, de 0,84 pour l'homozygote muté et de 0,34 pour l'effet récessif ; toutes non significatives (> 0,05).

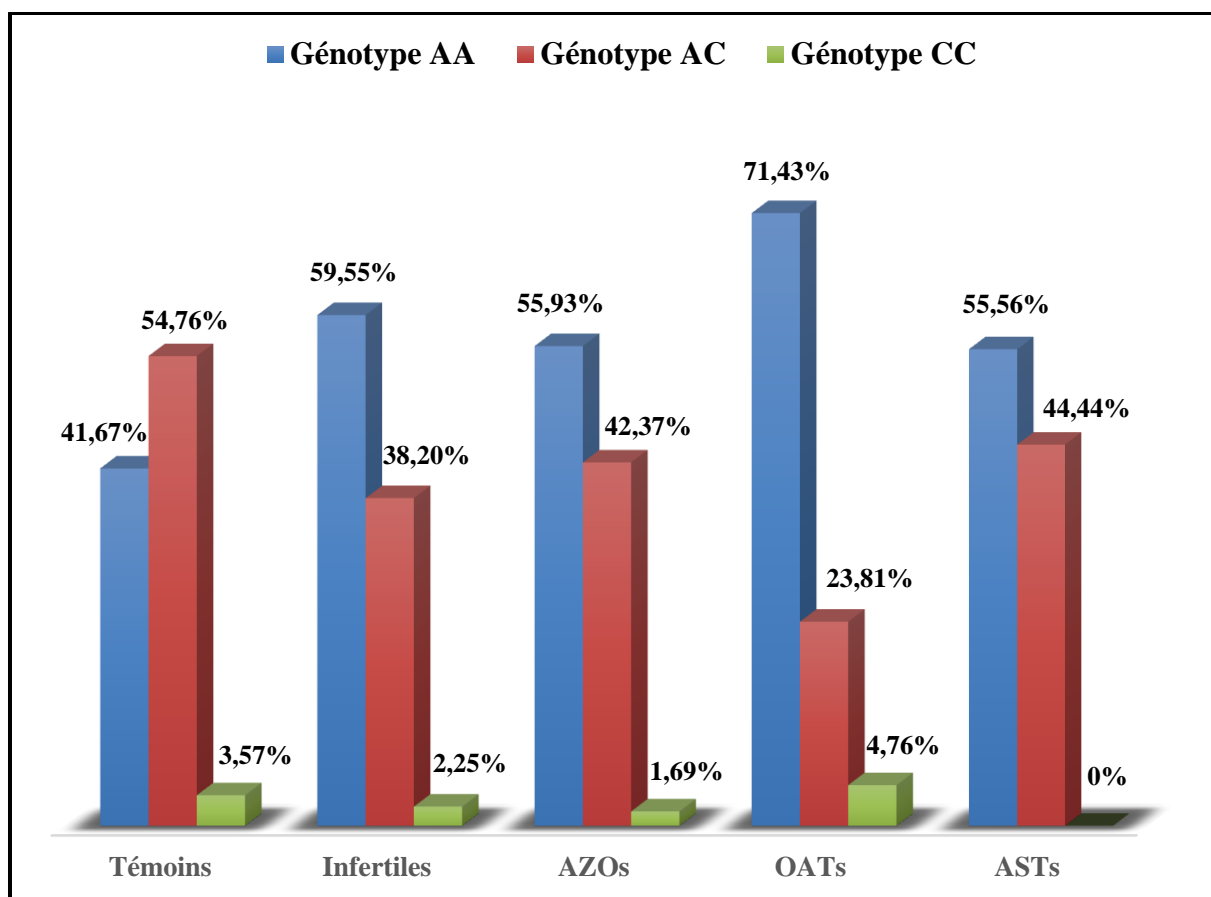


Figure 22 : Fréquences génotypiques du polymorphisme A1298C de la *MTHFR* (infertiles et témoins).

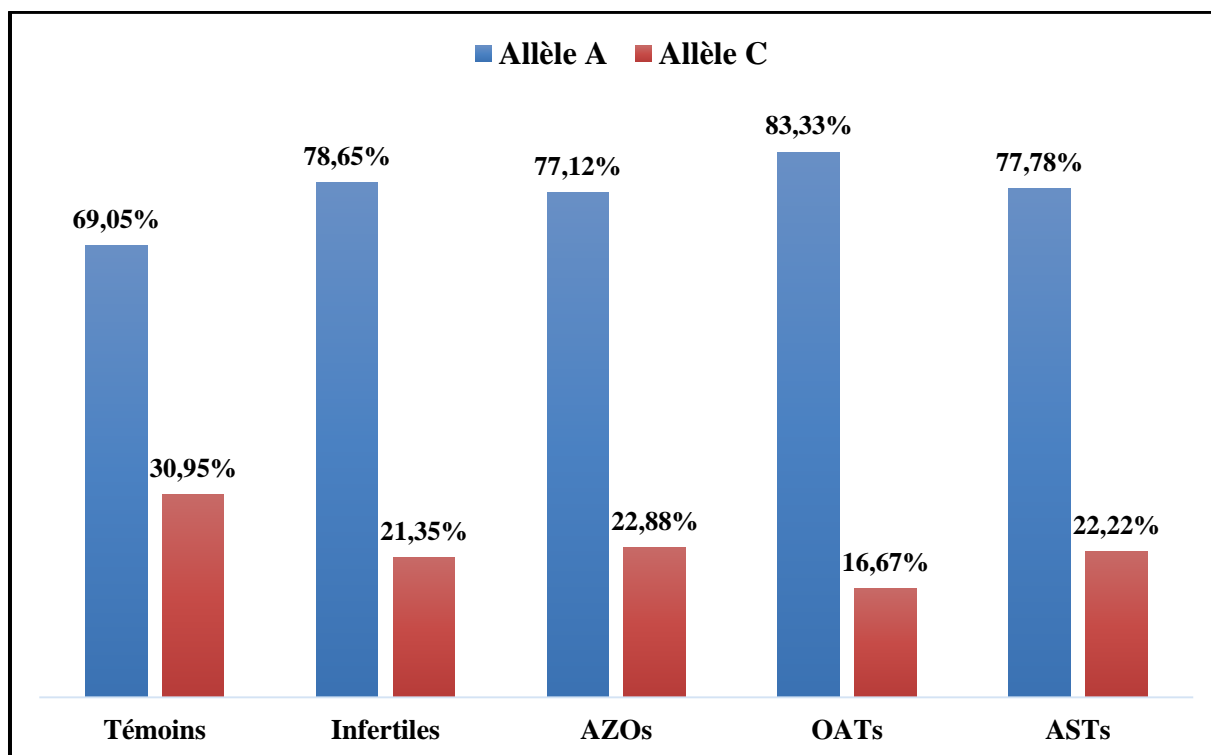


Figure 23 : Fréquences alléliques du polymorphisme A1298C de la *MTHFR* (infertiles et témoins).

L'analyse des fréquences alléliques met en évidence une différence de distribution de l'allèle C entre infertiles 21,35 % et témoins 30,95 %. La *p-value* calculée est de 0,49 ce qui suggère que cette divergence n'est pas statistiquement significative (**tableau 31**).

Tableau 31 : Résultats de l'analyse statistique du polymorphisme A1298C de la *MTHFR* établie par le test du χ^2 (infertiles et témoins).

	Témoins		Infertiles		OR	p
	%	n	%	n		
AA	41,67	35	59,55	53	-	-
AC	54,76	46	38,20	34	0,69 [0,36 - 1,33]	0,29
CC	03,57	03	02,25	02	1,62 [0,11 - 46,88]	0,84
AC + CC	58,33	49	40,44	36	0,71 [0,37 - 1,37]	0,34
Allele A	69,05	116	78,65	140	-	-
Allele C	30,95	52	21,35	38	0,81 [0,48 - 1,38]	0,49

L'analyse des résultats du génotypage de la *MTHFR* pour le polymorphisme A1298C démontre, et ce dans les trois sous-groupes d'infertiles, que le génotype AA est le plus fréquent (55,93 % chez les AZOs, 71,43 % chez les OATs et 55,56 % chez les ASTs) suivi respectivement de AC (42,37 % chez les AZOs, 23,81 % chez les OATs et 44,44 % chez les ASTs) et de CC (1,69 % chez les AZOs, 4,76 % chez les OATs et 0 % chez les ASTs). Cependant, chez les OATs, et à l'instar de ce qui a été signalé pour le polymorphisme (CAG)_n de la *POLG1*, la distribution des différents génotypes est bien particulière. En effet, c'est dans ce sous-groupe qu'on dénote la fréquence la plus élevée des génotypes AA (71,43 %) et CC (04,76 %) ainsi que la plus faible de toutes nos cohortes pour l'hétérozygote AC (23,81 %). Cependant, en comparaison avec les témoins, le calcul de l'OR et de la *p-value* prouve que ces différences sont statistiquement non significatives.

De même, la fréquence de l'allèle C est assez hétérogène dans toutes les cohortes d'infertiles (21,35 % chez les infertiles, 22,88 % chez les AZOs, 16,67 % chez les OATs et 22,22 % chez les ASTs), cependant, toutes plus faibles que celles observées chez les témoins (30,95 %). On note que la fréquence de cet allèle dans le sous-groupe des OATs est la plus faible et ce en comparaison avec les autres sous-groupes d'infertiles. Cependant, toutes ces différences sont statistiquement non significatives (**tableau 32**).

Tableau 32 : Résultats de l'analyse statistique du polymorphisme A1298C de la *MTHFR* établie par le test du χ^2 (sous-groupes d'infertiles et témoins).

	AA	AC	CC	AC + CC	C
AZOs n = 59 OR (95 % CI) P	55,93 % n = 33 - -	42,37 % n = 25 0,81 [0,39 - 1,69] 0,67	01,69 % n = 01 1,30 [0 - 49,89] 0,59	44,06 % n = 26 0,83 [0,40-1,70] 0,69	22,88 % n = 27 0,89 [0,49 - 1,60] 0,78
OATs n = 21 OR (95 % CI) p	71,43 % n = 15	23,81 % n = 05 0,36 [0,10 - 1,19] 0,10	04,76 % n = 01 2,87 [0 - 113,58] 0,95	28,57 % n = 06 0,42 [0,13 - 1,30] 0,15	16,67 % n = 07 0,60 [0,22 - 1,55] 0,34
ASTs n = 09 OR (95 % CI) P	55,56 % n = 05 - -	44,44 % n = 05 0,86 [0,18 - 4,05] 0,89	00 % n = 00 0 [0 - 185,18] 0,18	44,44 % n = 04 0,84 [0,17 - 3,95] 0,91	22,22 % n = 04 0,86 [0,22 - 3] 0,97
Témoins n = 84	41,67 % n = 35	54,76 % n = 46	03,57 % n = 03	58,3 % n = 49	30,95 % n = 52

Cette étude cas-témoins a pour objectif de déterminer, dans la population algérienne, l'impact du polymorphisme A1298C de la *MTHFR* dans la survenue de l'infertilité masculine. Les infertiles ainsi que les témoins de cette étude sont de la même origine géographique. Selon nos résultats, le polymorphisme A1298C ne constitue pas un facteur de risque pour ce dysfonctionnement dans notre population. À notre connaissance, ceci est la première étude cas-témoins pour évaluer le rôle de ce variant du gène *MTHFR* dans l'infertilité masculine en Algérie. La bibliographie rapporte plusieurs études qui ont été menées pour déterminer l'association entre le polymorphisme A1298C du gène *MTHFR* et l'infertilité masculine. La recherche de cette corrélation a donné des résultats parfois contradictoires (**tableau 33, figures 24 et 25**).

Le polymorphisme de la *MTHFR* a été évoqué pour la première fois en 2001 comme facteur de risque potentiel de l'infertilité masculine. En effet, dans une étude menée par **Bezold et al (2011)** environ 20 % des hommes consultant pour une infertilité se révélaient être homozygotes délétères pour le SNP C677T (TT), soit le double de la fréquence de ce génotype dans la population contrôle. Une étude réalisée sur la population algérienne de la même région géographique a rapporté une corrélation négative entre la survenue de l'infertilité masculine et le polymorphisme C677T du même gène (**Chellat et al., 2012**).

Tableau 33 : Recueil des fréquences génotypiques et alléliques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme A1298C de la *MTHFR*.

N°	Auteur	Pays	Infertiles						Témoins					
			Cohorte	AA (%)	AC (%)	CC (%)	A (%)	C (%)	Cohorte	AA (%)	AC (%)	CC (%)	A (%)	C (%)
1	Park JH <i>et al.</i> , 2005	Corée du sud	373	63,54	31,64	04,83	79,36	20,64	396	67,93	28,03	04,04	81,94	18,06
2	Lee HC <i>et al.</i> , 2006	Corée du sud	360	61,67	33,33	05,00	78,33	21,67	325	65,54	30,15	04,31	80,62	19,38
3	Dhillon VS <i>et al.</i> , 2007	Inde	179	50,28	44,69	05,03	72,63	27,37	200	51,50	42,00	06,50	72,50	27,50
4	Ravel C <i>et al.</i> , 2009	France	250	52,40	37,60	10,00	71,20	28,80	113	47,79	40,71	11,50	68,14	31,86
5	Singh K <i>et al.</i> , 2010	Inde	151	43,71	50,33	05,96	68,87	31,13	140	45,71	52,86	01,43	72,14	27,86
6	Safarinejad MR <i>et al.</i> , 2011	Iran	164	45,73	42,68	11,59	67,07	32,93	328	45,43	42,99	11,59	66,92	33,08
7	Gava MM <i>et al.</i> , 2011	Brésil	156	45,51	39,74	14,74	65,38	34,62	233	55,79	38,20	06,01	74,89	25,11
8	Eloualid A <i>et al.</i> , 2012	Maroc	344	59,59	35,47	04,94	77,33	22,67	690	53,62	43,91	02,46	75,58	24,42
9	Stangler-Herodež Š <i>et al.</i> , 2013	Slovénie	100	44,00	35,00	21,00	61,50	38,50	111	43,24	45,05	11,71	65,77	34,23
10	Gupta N <i>et al.</i> , 2013	Inde	611	27,00	52,37	20,62	53,19	46,81	136	19,85	54,41	25,74	47,06	52,94
11	Mfady DS <i>et al.</i> , 2014	Jordanie	150	47,33	40,67	12,00	67,67	32,33	150	39,33	50,00	10,67	64,33	35,67
12	Li SS <i>et al.</i> , 2014	Chine	82	59,76	35,37	04,88	77,44	22,56	133	66,17	27,07	06,77	79,70	20,30
13	Kurzawski M <i>et al.</i> , 2015	Pologne	284	45,07	45,77	09,15	67,96	32,04	352	44,32	44,32	11,36	66,48	33,52
14	Ni W <i>et al.</i> , 2015	Chine	296	61,15	35,81	03,04	79,05	20,95	204	67,16	30,39	02,45	82,35	17,65
15	La présente étude	Algérie	89	59,55	38,20	02,25	78,65	21,35	84	51,19	47,62	01,19	75,00	25,00

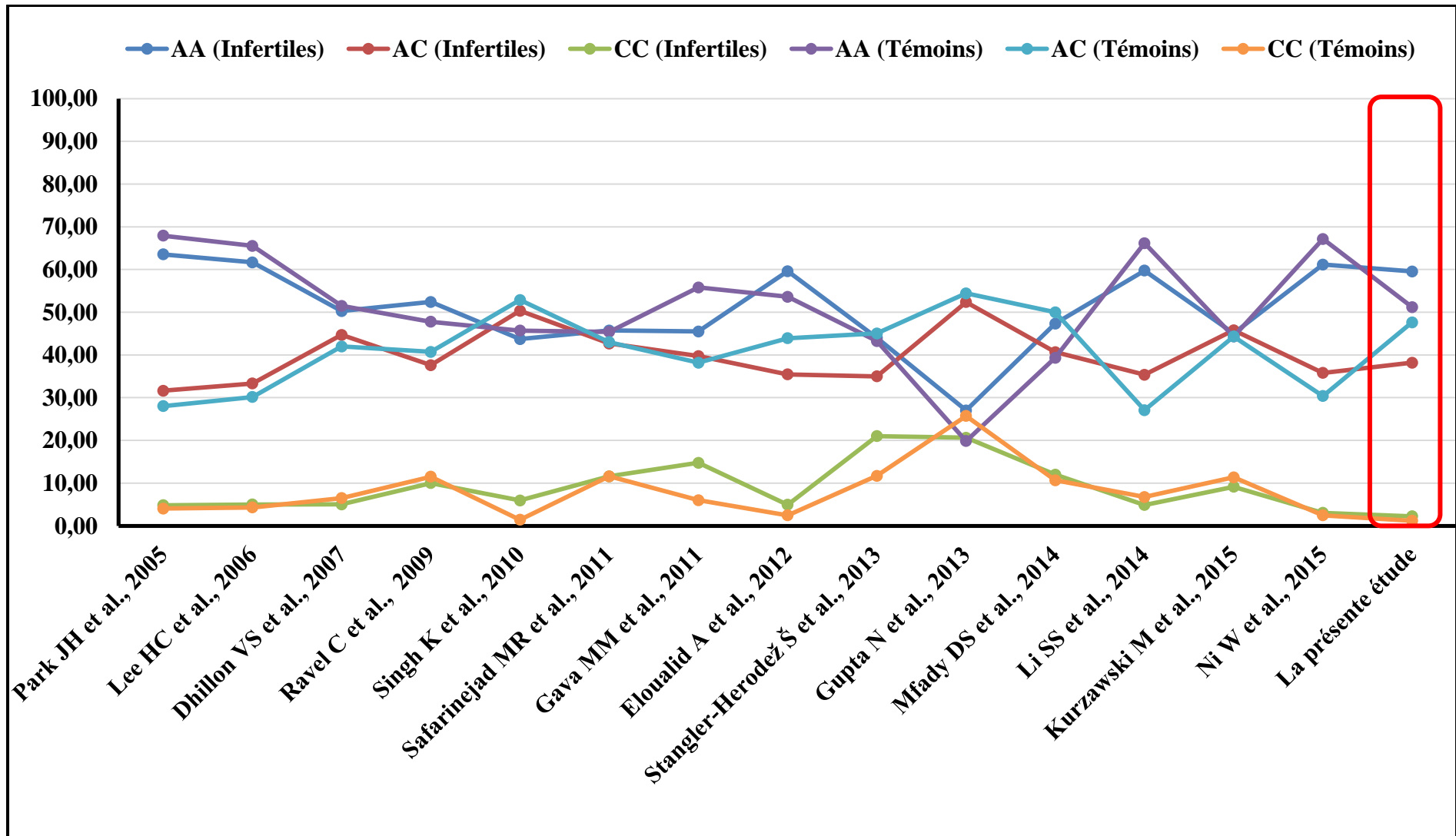


Figure 24 : Représentation graphique des fréquences génotypiques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme A1298C de la *MTHFR*.

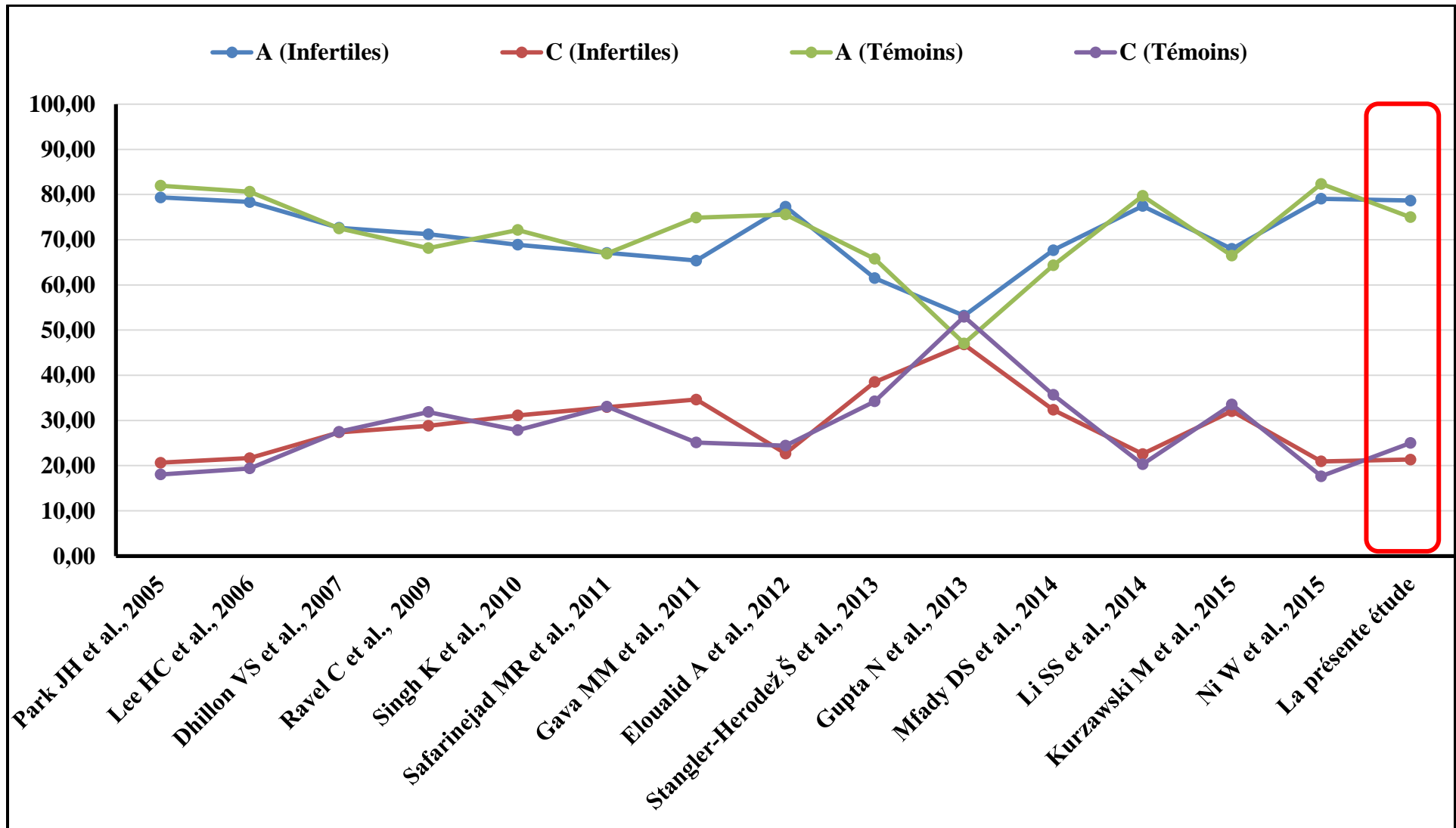


Figure 25 : Représentation graphique des fréquences alléliques rapportées dans différentes études de populations d'infertiles et de témoins du polymorphisme A129C de la *MTHFR*.

La contradiction dans ces résultats rapportés dans ces études illustrées précédemment peut être expliquée par des différences dans les populations étudiées, divers fonds génétiques, des variations ethniques et géographiques, ainsi qu'aux différentes expositions aux facteurs de risque environnementaux (**Gupta et al., 2013**).

Nos résultats sont cohérents avec de précédents rapports (**Park et al., 2005 ; Lee et al., 2006 ; Ravel et al., 2009 ; Montjean et al., 2011 ; Safarinejad et al., 2011**) qui n'ont trouvé aucune corrélation statistiquement significative entre le polymorphisme A1298C et l'infertilité masculine idiopathique.

Récemment et conformément à nos résultats, d'autres études ont aussi rapportées l'absence de signification statistique du polymorphisme A1298C chez des hommes infertiles de la Jordanie (**Mfady et al., 2014**), de la Chine (**Li et al., 2014 ; Ni et al., 2015**) et de la Pologne (**Kurzawski et al., 2015**).

Dans d'autres études menées sur les populations indiennes (**Singh et al., 2010**), brésiliennes (**Gava et al., 2011**), marocaines (**Eloualid et al., 2012**), slovènes (**Stangler-Herodež et al., 2013**) et chinoises (**Kim et al., 2015**) il a été rapporté que le polymorphisme d'intérêt peut être considéré comme un éventuel facteur de risque génétique de l'infertilité masculine.

La publication d'une méta-analyse en 2012 qui regroupe sept études cas-témoins avec 1633 hommes infertiles et 1735 témoins, a fourni des preuves de l'association entre le polymorphisme 1298AC de la *MTHFR* et le risque de l'infertilité masculine (**Wei et al., 2012**). Une autre méta-analyse, plus élargie, réalisée la même année incluant 2734 infertiles et 2737 témoins de 10 études cas-témoins publiées avant 2013, a indiqué également que le même polymorphisme est associé au risque de l'infertilité masculine, particulièrement avec l'azoospermie (**Shen et al., 2012**).

La bibliographie regorge de plusieurs arguments qui permettent aujourd'hui de considérer l'implication du métabolisme des folates dans l'infertilité masculine comme certaine. Cependant, la contribution réelle des variations de ce métabolisme ainsi que leurs effets sur la fonction reproductive de l'homme demeurent discutés.

Des études rapportent la présence de protéines de transport des folates dans le liquide séminal. Ces protéines semblent être secrétées uniquement par l'épithélium épидидymaire et différentiel et se retrouvent en partie dans des vésicules qui adhèrent aux spermatozoïdes une fois que ceux-ci ont traversé le canalicule épидидymaire. Les raisons de cette localisation particulière ne sont pas connues, mais il n'est pas exclu qu'il s'agisse d'un système d'internalisation des folates dans les spermatozoïdes au cours de leur maturation (**Malm et al., 2005**).

Plusieurs études ont cherché à mettre en évidence un effet d'une supplémentation en folates sur la production et la qualité des gamètes mâles. Ainsi, un premier travail avait conclu à un effet bénéfique d'une supplémentation journalière de 15 mg d'acide folinique (5-formylTHF) pendant trois mois sur la numération et la mobilité chez 65 hommes infertiles. Dans cette même étude, 24 couples avaient obtenu une grossesse dans les six mois qui suivaient ce traitement (**Bentivoglio et al., 1993**). Dans une autre étude conduite auprès d'une centaine d'hommes avec une oligozoospermie modérée, seule l'association de folates et de zinc permettait d'obtenir une amélioration significative de 79 % de la numération, alors que les folates seuls n'amélioraient ce paramètre que de 40 % sans atteindre le seuil de significativité (**Wong et al., 2002**). Plus récemment, cette équipe a confirmé le bénéfice d'un tel traitement combiné, mais l'amélioration de la numération n'était plus que de 18 %, sans modifications des paramètres endocriniens (**Ebisch et al., 2006**).

L'utilisation des modèles animaux a enrichi la compréhension de l'implication de ce métabolisme dans la fertilité masculine. Ainsi, il a été démontré que chez le rat, une carence en folates était responsable d'une diminution de la spermatogenèse (**Mayr et al., 1999**). De même, l'usage d'inhibiteurs qui interrompent le recyclage des folates, entraînait une diminution de la numération et de la mobilité des spermatozoïdes chez le rat et la souris (**Kalla et al., 1997**). Toujours chez la souris, l'utilisation d'un agent hypométhylant, entraîne soit une atrophie des tubes séminifères avec azoospermie, soit une réduction importante de la spermatogenèse (**Oakes et al., 2007**). En plus de cibler la production des gamètes, les réactions de méthylation interviennent probablement dans le contrôle de la stéroïdogénèse, comme le suggère l'effet stimulant de la SAM sur la synthèse de testostérone dans les cellules murines de Leydig (**Raman et al., 1995**). Ces auteurs ont démontré que l'expression de la *MTHFR*, enzyme clef du métabolisme des folates, est environ 5 fois plus grande dans le testicule que dans les autres organes. De l'activité de cette enzyme dépendra leur utilisation préférentielle, soit pour la synthèse des acides nucléiques, soit pour la reméthylation de l'homocystéine.

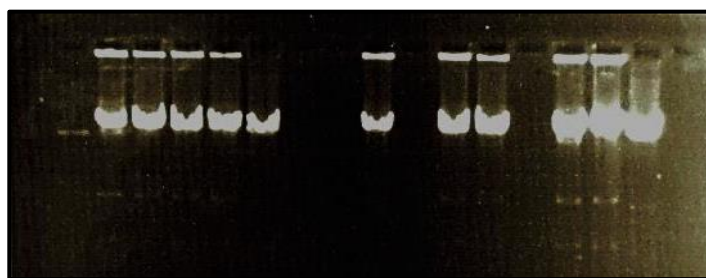
Depuis, de nombreuses études de type cas-témoins, rapportant par ailleurs des résultats contradictoires, ont été réalisées pour tenter de mettre en évidence le rôle éventuel sur la fertilité masculine des deux polymorphismes dans le gène *MTHFR* : 677CT et 1298AC en prospectant cette association. Les données rapportées jusqu'à aujourd'hui indiquent une vraisemblable implication du premier polymorphisme comme facteur de risque de l'infertilité masculine (**Zu et al., 2016**). Cependant, les données concernant l'implication du second, A1298C, doivent être confirmées (**Liu et al., 2015**).

En résumé ; ces résultats sont difficilement interprétables car la fréquence des polymorphismes de la *MTHFR* dans la population générale montre des différences indéniables. La fréquence de distribution du polymorphisme A1298C de la *MTHFR* n'est pas étudiée de manière aussi étendue que celle du polymorphisme C677T du même gène. Les données actuelles suggèrent que l'allèle muté C est rarement retrouvé chez les africains, les asiatiques et les hispaniques et que le génotype *MTHFR* 1298CC est essentiellement rencontré chez les caucasiens plus que dans d'autres ethnies. En effet, un gradient descendant Nord-Sud a été observé pour ce polymorphisme. De fait, sa fréquence est très faible dans les populations africaines sub-sahariennes en comparaison avec les populations du Nord continent. Une des hypothèses expliquant cette discordance selon les populations étudiées pourrait être un régime particulièrement riche en folates dans les populations européennes, due à une meilleure hygiène de vie, ce qui pourrait annuler ou du moins minimiser l'effet de ce polymorphisme. Par ailleurs, les bénéfices potentiels d'une supplémentation en folates sur la capacité reproductive de l'homme devront être mieux caractérisés.

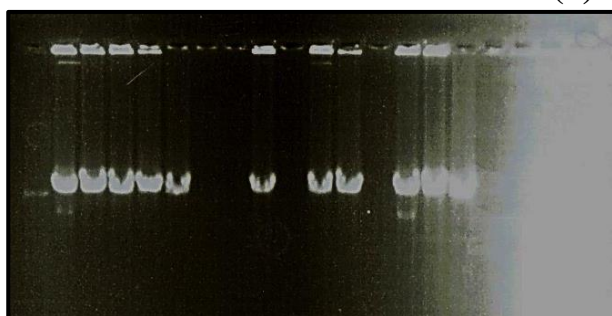
V- PCR longue de l'ADNmt :

La plupart des dysfonctionnements de la mitochondrie impliquant son génome sont associés à des mutations ponctuelles ou à de larges délétions. Ces mutations sont récessives et peuvent entraîner des maladies lorsque le taux d'ADNmt muté est supérieur à 90 % pour une mutation ponctuelle ou bien supérieur à 60 % pour une délétion (**Porteous et al., 1998**).

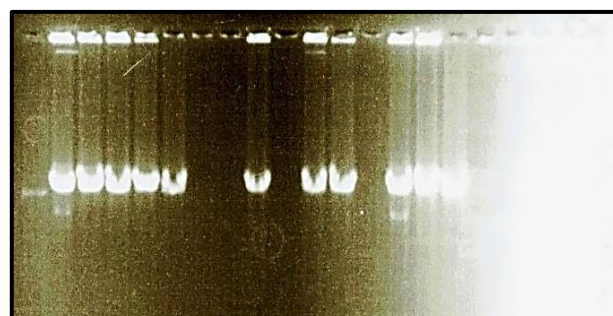
Notre hypothèse de travail dans l'abord des délétions de l'ADNmt est qu'une perte graduelle de l'efficacité du métabolisme oxydatif mitochondrial peut mener à des conséquences pathologiques selon un cercle incluant les étapes suivantes : tout d'abord, des mutations somatiques de l'ADNmt s'accumulent en conséquence des particularités liées à ce génome. Par la suite, l'effet cumulatif de ces altérations diminue la phosphorylation oxydative. La déstabilisation de la phosphorylation oxydative accélère la production d'EROs dans la mitochondrie qui induit d'autres délétions ; mutations qui peuvent être mises en évidence sur des mitochondries leucocytaires. Cette hypothèse découle des travaux de **Harman (1956)** démontrant l'implication des radicaux libres, générés lors du fonctionnement de la CRM, sur l'initiation des lésions cellulaires. Afin d'explorer cette piste, nous avons soumis nos échantillons à une PCR longue pour détecter et mettre en évidence d'éventuelles délétions présentes dans les leucocytes et de vérifier, si celles-ci, sont bien associées à l'infertilité masculine. Après amplification de l'ADNmt et migration sur gel d'agarose, des photos ont été prises pour les infertiles (**photographies 11 et 12**) et les témoins.



(a)



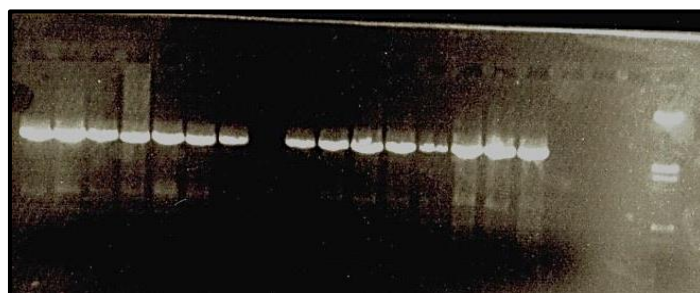
(b)



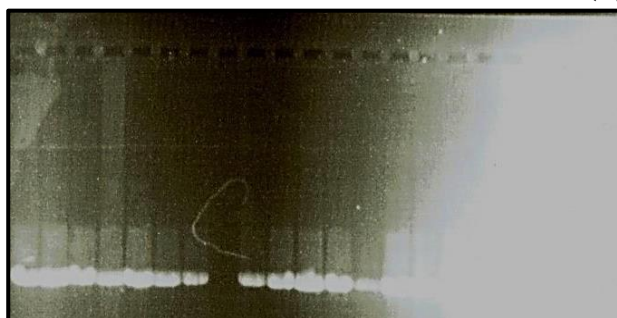
(c)

Photographies 11 : Profil de migration des amplicons XL1/XL2 de l'ADNmt pour une série d'infertiles en présence du marqueur III.

(a) migration à 45 V pendant 4 heures, (b) migration à 25 V pendant 24 heures (D25), (c) migration à 25 V pendant 24 heures (D50).



(a)



(b)



(c)

Photographies 12 : Profil de migration des amplicons OF/BR de l'ADNmt pour une série d'infertiles en présence du marqueur III.

(a) migration à 45 V pendant 4 heures, (b) migration à 25 V pendant 24 heures (D25), (c) migration à 25 V pendant 24 heures (D50).

Si la plupart des maladies mitochondriales sont d'origine génétique, des syndromes similaires peuvent être causés par des toxiques ou des médicaments agissant sur cet organe. Un rôle des mitochondries dans le processus du vieillissement normal a été suggéré en rapport avec les théories impliquant les radicaux libres et étayé par la suite de découverte de larges délétions de l'ADNmt rapportée chez différents individus au cours du vieillissement (**Zhang et al., 2003**).

Les premières caractérisations de dommages lors du vieillissement dans l'ADNmt sont apparues avec les découvertes de nombreuses délétions à partir de divers tissus provenant d'adultes humains ou de rats et de leur augmentation progressive avec l'âge du sujet (**Holt et al., 1988**). Ainsi, par PCR, la délétion commune de 4977 a été détectée dans le muscle squelettique, dans le cœur et dans le cerveau d'individus âgés (**Soong et al., 1992**) mais également dans le tissu osseux de patients présentant des cas d'ostéoporose (**Pahipa et al., 1998**). Une autre délétion importante de 7436 pb (de 8649 à 16084) a été détectée dans le tissu cardiaque et dans le cortex du cerveau (**Hayakawa et al., 1993**) d'individus âgés ne présentant pas de pathologies. De manière similaire, une augmentation avec l'âge dans le taux d'une délétion de 6063 pb (de 7842 à 13904) a été révélée dans l'ADNmt de foie humain (**Yen et al., 1992**) et des multiples délétions de tailles variables dans différents tissus. D'autres délétions moins bien caractérisées ont été décrites : 5827 pb (de 7993 à 13786), 6335 pb (de 8477 à 14811) et 7635 pb (de 8440 à 16074). La recherche de ces délétions se fait essentiellement par PCR longue (**Langping et al., 2002**). Aucun des profils de migrations des amplicons XL1/XL2 et OF/BR analysé ne révèle une quelconque délétion de l'ADNmt. Cependant, cela n'exclue pas la présence de microdélétions non visualisables sur un profil de migration électrophorétique.

Une étude réalisée en 2003 sur la délétion 4977pb a évalué la possibilité d'une transmission maternelle des délétions dans des leucocytes humains. Cette étude a recherché la présence de cette délétion dans des lignées maternelles humaines, représentées par 21 familles incluant 4 générations. Ces auteurs ont identifié la présence de la délétion 4977 pb dans les leucocytes de 71 individus d'un âge compris entre 8 mois et 99 ans. Ces résultats positifs incluent tous les enfants et ceux-ci ne présentaient pas de maladies mitochondriales connues. Ces résultats démontrent la possibilité d'une transmission maternelle des délétions en dehors d'une symptomatologie clinique apparente (**Thayer et al., 2003**).

Plusieurs études, initiées par celle de **Kao et al** en 1995 ont démontré qu'une délétion de l'ADNmt du spermatozoïde de 4977 pb serait associée à une baisse de la motilité et même à une baisse de la fertilité masculine. Cependant, l'incidence de cette délétion serait différente selon le diagnostic d'infertilité ; elle surviendrait plus fréquemment chez les infertiles azoospermiques et oligozoospermiques que chez les individus normaux. De plus, elle est plus élevée chez les hommes avec une infertilité primaire que secondaire. Selon la même étude, aucune délétion n'a été retrouvée dans les spermatozoïdes d'hommes fertiles et en bonne santé (**Kao et al., 1995**). Par la suite ces mêmes auteurs ont identifié la présence de deux autres délétions ; 7345 et 7599 pb associées à une faible motilité des spermatozoïdes (**Kao et al., 1998**). Ces observations ont été par la suite reproduites dans trois autres études (**St John et al., 2001 ; Kumar et al., 2009 ; Leremiadou et al., 2009**).

En 2001, des auteurs qui ont rapporté ces délétions chez des asthénozoospermiques ont avancé l'hypothèse que la respiration défectueuse dans les mitochondries de spermatozoïdes serait responsable de la production excessive d'EROs à l'origine de ces altérations dans l'ADNmt (**St John et al., 2001**). Par la suite, l'étude de **Kumar et al** a démontré que les infertiles arborant dans leurs spermatozoïdes des délétions multiples de l'ADNmt avaient en parallèles des variations nucléotidiques dans les gènes de l'*ATPase 6* et *8*, *ND2*, *3*, *4* et *5* argumentant ainsi un impact possible de la génération d'EROs sur ces mutations (**Kumar et al., 2009**). Ces délétions, sporadiques pour la plupart, ne se produisent pas tout à fait au hasard, et sont dues à des recombinaisons illégitimes entre simples brins d'ADN au niveau de séquences homologues ou répétées. À titre d'exemple, les bornes de la délétion 4977 sont encadrées par une séquence répétée directe de 13 pb (**Ballinger et al., 1994**).

Le processus conduisant à des délétions dans l'ADNmt n'a pas encore été élucidé. Cependant, deux mécanismes sont actuellement avancés pour expliquer leur formation ; le premier repose sur une erreur se produisant au cours de la réplication de type non synchronisée avec glissement de brin, le deuxième repose sur une erreur se produisant lors de la réparation des cassures doubles brin (**Krishnan et al., 2008**).

VI- PCR quantitative :

Pour évaluer l'aspect quantitatif des altérations du génome mitochondrial, nous avons réalisé une étude comparative du taux d'ADNmt dans les leucocytes périphériques extraits d'hommes infertiles et de témoins fertiles pour apprécier la distribution de ce paramètre dans les deux cohortes. Cette évaluation a été réalisée par l'utilisation de PCR quantitative en temps réel. Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer la présence de modifications quantitatives de l'ADNmt par la comparaison des résultats du rapport *ND2/ATPase*.

Dans notre hypothèse de travail, le principe est que l'altération du nombre de copies de l'ADNmt des leucocytes peut refléter le stress oxydatif. Ainsi, la variation du nombre de copies de l'ADNmt peut servir comme un marqueur génétique du stress oxydatif d'origine mitochondrial. La présente étude a été entreprise pour déterminer si le nombre de copies d'ADNmt dans les leucocytes est altéré chez les sujets infertiles en comparaison avec un échantillon d'hommes fertiles en bonne santé apparente et d'affirmer ainsi si les modifications de ce paramètre sont bien corrélées avec l'étiologie du dysfonctionnement étudié. Pour cela nous avons soumis les résultats obtenus par PCR quantitative à plusieurs tests statistiques :

1- Test de *Shapiro-wilk* (normalité) :

L'analyse de la distribution des rapports *ND2/ATPase* calculés par PCR quantitative et ce pour nos quatre cohortes a été soumise au test de normalité de *Shapiro-wilk*. En effet, l'utilisation de la loi Normale nous permet d'examiner différents indicateurs de normalité d'une distribution (nombre de valeurs hors norme, différence entre moyenne et médiane, coefficients d'aplatissement et d'asymétrie). On vérifie l'asymétrie et l'aplatissement dont les valeurs doivent rester comprises entre -1 et +1. Cependant, et du fait que cette loi s'applique seulement quand la taille de l'échantillon est ≥ 30 , nous avons utilisé comme alternative le test de *Shapiro-Wilk* pour lequel $3 \leq n \leq 500$. L'application de ce test à nos données permet de mettre en évidence une distribution normale du paramètre étudié pour les témoins ainsi que pour les OATs. Les valeurs des coefficients de variation (respectivement de 31 et 44 %) et de l'asymétrie (respectivement de 0,392 et 0,340) étaient dans les normes avec des variances et des écarts-type moins marqués que ceux observés dans les autres groupes. De même, une représentation graphique des valeurs mesurées (**figures 26 et 30**) montre que les points sont alignés. Enfin la valeur *w* du test était supérieure au seuil de signification choisi (0,05) (0,488 pour les OATs et 0,857 pour les témoins) confirmant ainsi la normalité de la distribution (**tableau 34**).

Cependant, dans les AZOs et les ASTs, la distribution ne suit pas une loi normale et est caractérisée par des coefficients de variation (respectivement de 55, 57 et 31 %) et d'asymétrie (respectivement de 2,35, 3,091 et 1,21) qui diffèrent des normes prédites par cette loi. Les variances et des écarts-types montrent des fluctuations beaucoup plus marquées que celles observées dans les groupes précédents présentant une distribution normale. La représentation graphique (**figures 26, 27, 28, 29 et 30**) montre que les points ne sont pas alignés. Enfin, la valeur de w est inférieure à 0,05 (pour les infertiles, pour les AZOs et pour les ASTs) ce qui confirme que la distribution ne suit pas une loi normale. Ces résultats suggèrent une perturbation de ce paramètre chez les AZOs et les ASTs (**tableau 34**).

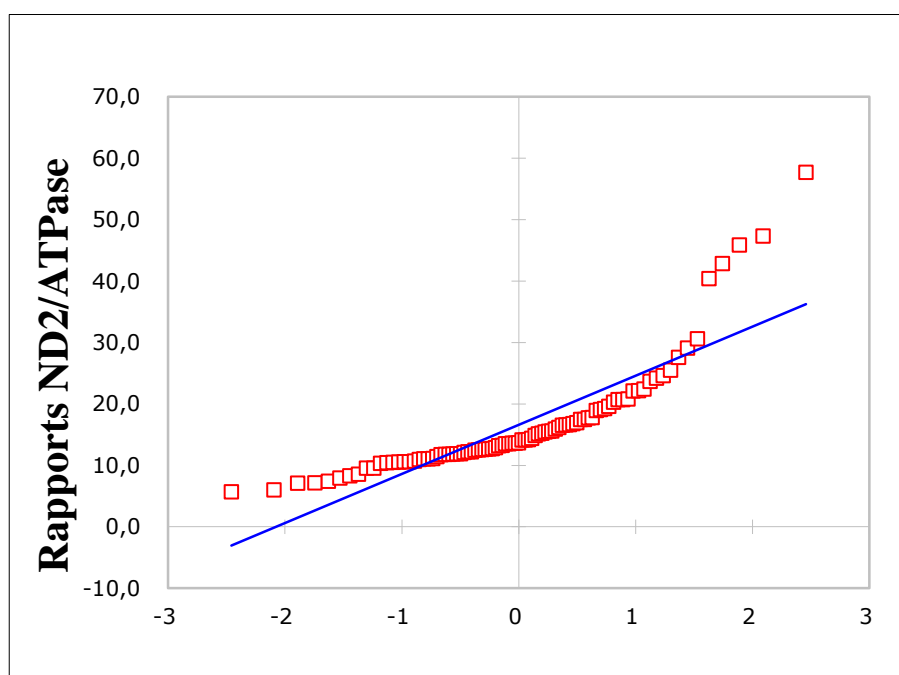


Figure 26 : Représentation graphique des résultats du test de *Shapiro-Wilk* pour les infertiles.

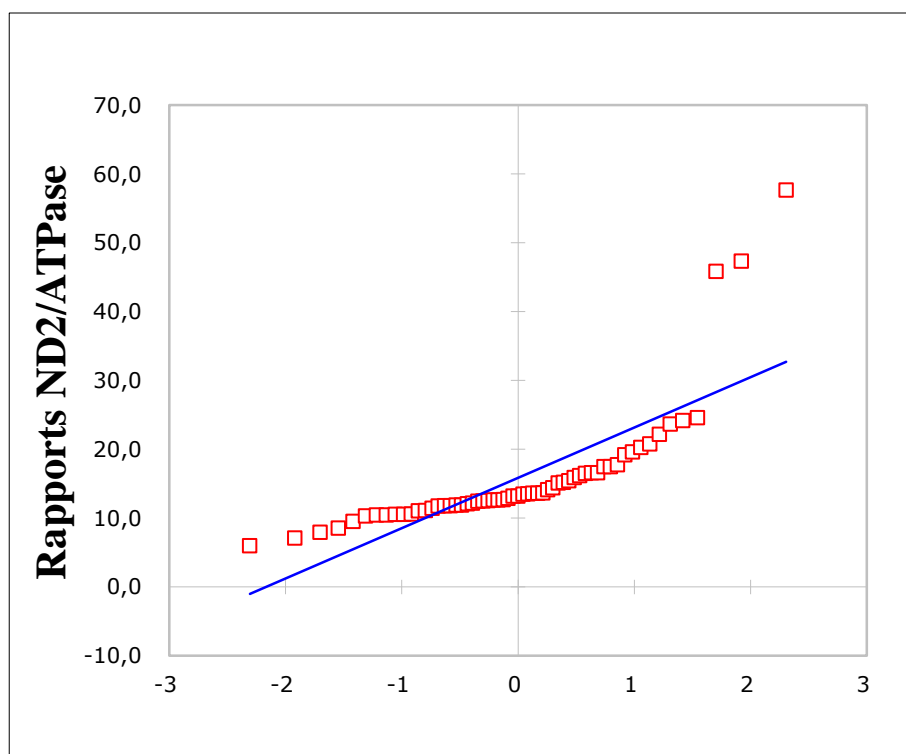


Figure 27 : Représentation graphique des résultats du test de *Shapiro-Wilk* pour les AZOs.

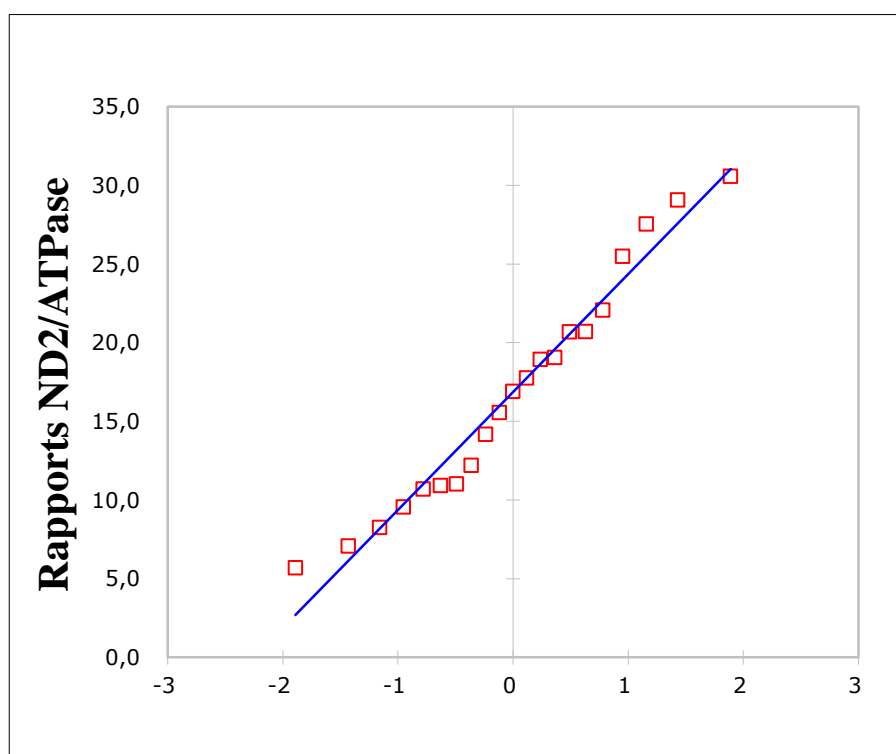


Figure 28 : Représentation graphique des résultats du test de *Shapiro-Wilk* pour les OATs.

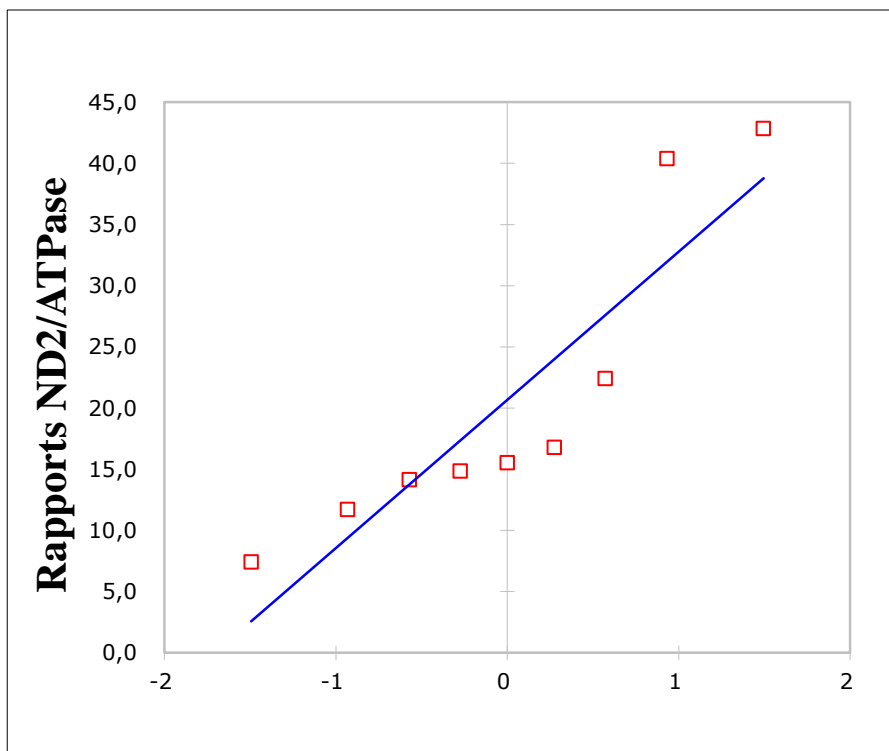


Figure 29 : Représentation graphique des résultats du test de *Shapiro-Wilk* pour les ASTs.

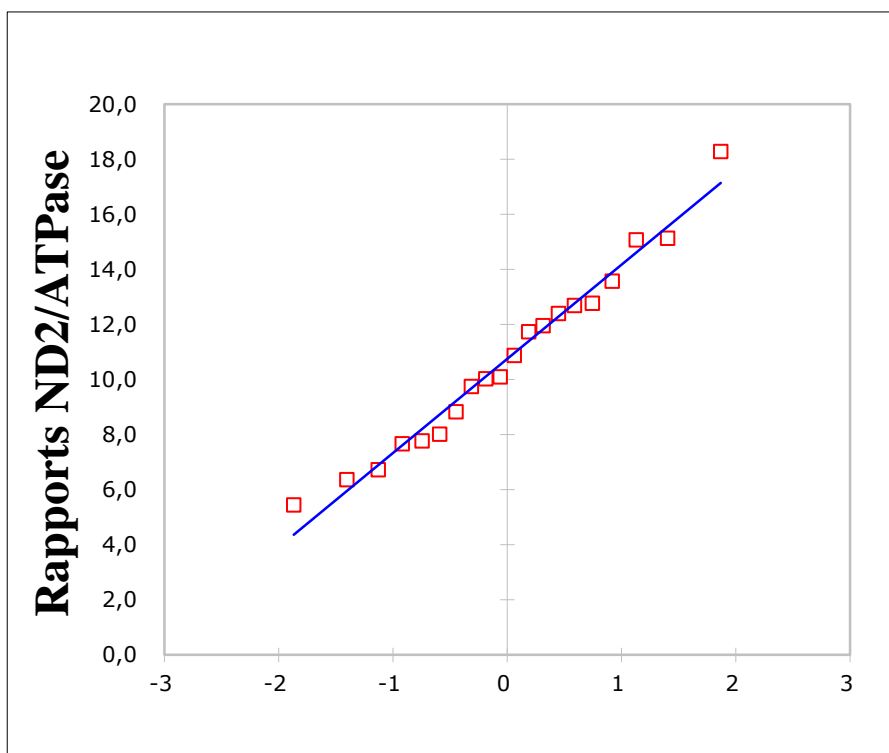


Figure 30 : Représentation graphique des résultats du test de *Shapiro-Wilk* pour les témoins.

Tableau 34 : Résultat du test de *Shapiro-Wilk* appliqué à notre population d'étude.

	Infertiles	AZOs	OATs	ASTs	Témoins
Effectif	89	59	21	09	20
Moyenne	16,584	15,861	16,859	20,681	10,754
Variance	82,729	82,094	53,911	157,113	11,089
Écart type	09,096	09,061	07,342	12,534	3,330
Médiane	13,672	13,221	16,916	15,547	10,482
Coefficient de variation	55 %	57 %	44 %	61 %	31 %
ABS (Moyenne - Médiane)	2,912	2,640	0,057	5,134	0,271
Valeur maximale	5,69	6,01	5,69	7,42	5,44
Valeur minimale	57,69	57,69	30,58	42,85	18,28
Asymétrie (-1 ≥ norme ≤ +1)	2,359	3,091	0,340	1,210	0,392
Aplatissement (-1 ≥ norme ≤ +1)	6,611	10,741	- 0,837	0,133	- 0,190
Proportion hors norme	5,62 %	5,08%	0 %	0 %	5%
Effectif hors-norme inférieure	0	0	0	0	0
Effectif hors-norme supérieure	5	3	0	0	1
W	0,75980	0,64318	0,95859	0,81346	0,97513
<i>p-value</i>	0,00000	0,00000	0,48828	0,02906	0,85717
Niveau de signification	0,05 (CI = 95%)				
Conclusion	Rejetée	Rejetée	Acceptée	Rejetée	Acceptée

2- Test de *Student* (conformité) :

Le test de *Student* aussi appelé test de conformité permet de vérifier si notre échantillon provient bien d'une population avec la moyenne spécifiée, μ_0 , ou s'il y a une différence significative entre la moyenne de l'échantillon (infertiles, AZOs, OATs et ASTs) et la moyenne présumée de la population (témoin) pour le paramètre étudié. L'application de ce test sur les valeurs des taux d'ADNmt calculés par PCR quantitative démontre que les moyennes observées pour la valeur étudiée dans les différentes cohortes d'infertiles diffèrent significativement par rapport à la moyenne théorique (moyenne dans la cohorte de témoins).

Tableau 35 : Résultat du test de *Student* appliqué à notre population d'étude.

		Infertiles	AZOs	OATs	ASTs	Témoins
Effectif		89	59	21	09	20
Moyenne		16,58	15,86	16,85	20,68	10,75
<i>p</i> bidirectionnel		0,0000	0,0001	0,0011	0,0448	
<i>p</i> unidirectionnel	H0 obs > théorique <i>p</i>	0,0000	0,0000	0,0005	0,0224	
	H0 obs < théorique <i>p</i>	1,0000	1,0000	0,9995	0,9776	
Seuil		0,05 (CI = 95%)				
Conclusion		Rejetée	Rejetée	Rejetée	Rejetée	

3- Test de *Brown-Forsyth* (analyse de la variance) :

Après une recherche bibliographique bien documentée, parmi les nombreux tests d'homogénéité des variances que rapporte la littérature, le test de *Brown-Forsythe* (**Brown et Forsythe, 1974**), variante du test de *Levene* (**Levene, 1960**), basé sur les écarts absolus à la médiane de chaque groupe, paraît le plus adapté et offre, dans ce contexte, un bon compromis entre puissance et robustesse face aux écarts à la normalité. Ils sont toutefois moins puissants que le test de *Bartlett*, surtout lorsque les effectifs sont faibles ($n < 15$) qui malheureusement s'effondre totalement dès que l'on s'écarte, même légèrement, de la distribution gaussienne. Le fait d'utiliser dans le test de *Levene* la médiane plutôt que la moyenne comme paramètre de position le rend plus robuste dans le cas où la distribution des données est asymétrique. Le test tolère donc de plus grands écarts à la normalité.

L'application du test de *Brown-Forsyth* de la variance démontre que les observations pour la valeur étudiée dans les différentes cohortes d'infertiles et de témoins ne sont pas significativement hétérogènes et ce même si les tests de *Shapiro-Wilk* et de *Student* ont mis en évidence une distribution hétérogène des valeurs calculées pour le paramètre quantitatif étudié (tableau 36).

Tableau 36 : Résultat du test de *Brown-Forsyth* appliqué à notre population d'étude.

	Infertiles	AZOs	OATs	ASTs	Témoins
Effectif	89	59	21	9	20
Moyennes	16,58	15,86	16,86	20,68	10,75
Médianes	13,67	13,22	16,92	15,55	10,48
Écart types	9,096	9,061	7,342	12,534	3,330
Variances	82,729	82,094	53,911	157,113	11,089
Min	5,69	6,01	5,69	7,42	5,44
Max	57,69	57,69	30,58	42,85	18,28
Asymétrie	2,358	3,090	0,339	1,209	0,392

Test de <i>Levene</i> sur les variances des groupes, utilisant les écarts à la médiane							
Sources	ddl	SCE	CM	F	<i>p</i>	F limite à 5%	F limite à 1%
Traitements	4	248,7501	62,18754	1,16	0,3302	2,42	3,42
Résiduelle	193	10352,8	53,64145				
Totale	197	10601,55					

4- Test de *Kruskal-Wallis* (comparaisons multiples) :

Ce test est souvent utilisé comme une alternative à l'ANOVA dans le cas où l'hypothèse de normalité n'est pas acceptable (vérifiée précédemment par le test de *Shapiro-wilk*). Il permet de tester si k échantillons ($k > 2$) proviennent de la même population, ou de populations ayant des caractéristiques identiques, au sens d'un paramètre de position. Le paramètre de position est conceptuellement proche de la médiane, mais le test de *Kruskal-Wallis* prend en compte plus d'information que la position au seul sens de la médiane. Cette méthode non-paramétrique a été développée lorsque on ne connaît pas les paramètres de la variable étudiée dans la population (d'où le terme non-paramétrique ou de méthodes sans paramètres ou sans distributions).

Ces méthodes n'impliquent pas l'estimation de paramètres (comme la moyenne ou l'écart-type) décrivant la distribution de la variable étudiée dans la population.

Nous avons utilisé ce test non paramétrique sachant que la distribution de la valeur étudiée n'obéit pas à la loi de normalité dans toutes nos cohortes. Ce test nous a permis de faire les comparaisons deux à deux (comparaisons multiples ou "post hoc") non paramétriques, tenant compte du nombre de groupes dans l'expérience.

Tableau 37 : Résultat du test de *Kruskal-Wallis* appliqué à notre population d'étude.

(Sér.1 : Témoins, Sér.2 : Infertiles, Sér.3 : AZOs, Sér.4 : OATs, Sér.5 : ASTs).

	alpha						
<i>Bidirect.</i>	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	
<i>Unidirect.</i>	0,15	0,125	0,1	0,075	0,05	0,025	
Choix n° =>	3	4	5	6	7	8	
Votre choix :	7						
Différences	Valeurs		Les différences supérieures ou égales à 'valeur' sont significatives au seuil choisi				
Sér.1-Sér.2 =	164,00	valeur =					25,76
Sér.1-Sér.3 =	80,50	valeur =					25,76
Sér.1-Sér.4 =	24,00	valeur =					25,76
Sér.1-Sér.5 =	6,50	valeur =					25,76
Sér.2-Sér.3 =	83,50	valeur =					25,76
Sér.2-Sér.4 =	140,00	valeur =					25,76
Sér.2-Sér.5 =	170,50	valeur =					25,76
Sér.3-Sér.4 =	56,50	valeur =					25,76
Sér.3-Sér.5 =	87,00	valeur =					25,76
Sér.4-Sér.5 =	30,50	valeur =	25,76				
	Bidirectionnel		Unidirectionnel				
<i>alpha</i> =	0,05	0,01	0,05	0,01			
Choix n° :	3	4	5	6			
Votre choix :	3						
Différences	Valeurs		Les différences supérieures ou égales à 'valeur' sont significatives au seuil choisi				
Contr - Sér.2 :	164,00	valeur =					24,40
Contr - Sér.3 :	80,50	valeur =					24,40
Contr - Sér.4 :	24,00	valeur =					24,40
Contr - Sér.5 :	6,50	valeur =	24,40				

Ces résultats mettent en évidence une différence significative d'une part entre témoins et infertiles et d'autres part entre témoins et AZOs. Cependant, les différences entre témoins et OATs et entre témoins et ASTs ont été jugées non significatives par ce test (**tableau 37**).

Les résultats obtenus confirment la perturbation du nombre de copies de l'ADNmt dans les cohortes des infertiles ainsi que celles de ceux atteints d'AZO et d'AST mais pas dans celle avec une OATs. Cela suggère une modification du nombre de copies de l'ADNmt associée à l'azoospermie et à l'asthénozoospermie. Cependant les conclusions tirées de cette quantification relative de l'ADNmt devront être prises avec prudence. En effet, la technique utilisée pour la quantification, la taille réduite de nos cohortes ainsi que les fluctuations du nombre de copies de l'ADNmt qui peut être imputable à un autre dysfonctionnement mitochondrial (génétique ou réactif) ne permettent pas de tirer des conclusions définitives sur cette variation observée.

À notre connaissance, cette démarche méthodologique n'a jamais été appliquée à l'étude des infertilités masculines. Cependant, la littérature rapporte 9 études, similaires dans l'approche, ayant prospecté l'implication du taux d'ADNmt leucocytaire dans divers désordres. Les indications relatives à ces études sont mentionnées dans le tableau 38.

Tableau 38 : Récapitulatif des études ayant prospecté la signification du taux d'ADNmt leucocytaire (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ consulté le 07/02/2016).

Étude	Thématique abordée
Huang et al., 2011	Syndromes métaboliques.
Kim et al., 2013	L'activité de la télomérase chez les femmes âgées (longévité).
He et al., 2013	Troubles dépressifs majeurs chez l'adolescent.
De Sousa et al., 2014	Troubles bipolaire.
Hofmann et al., 2014	Cancer rénal, cancers colorectal, de la prostate, du poumon, et de l'ovaire.
He et al., 2014	Lésions buccales précancéreuses.
Huang et al., 2014	Cancer colorectal.
Liu et al., 2015	Maladie pulmonaire obstructive chronique.
Qiu et al., 2015	Longueur des télomères chez les femmes enceintes.

Aujourd'hui, les mécanismes mis en jeu dans le contrôle du nombre de copies de l'ADNmt sont mal connus. Ils pourraient intervenir à différentes étapes de la réplication. Les facteurs régulateurs évoqués sont notamment mtTFA, l'ARNase MRP, mtSSB (mitochondrial Single Strand Binding protein) et l'ADN polymérase γ .

La modification du nombre de copies d'ADNmt, associée initialement avec le vieillissement des tissus pos-mitotiques, a été étudiée et rapportée dans diverses pathologies. Une augmentation de la teneur de l'ADNmt a été suggérée comme étant un mécanisme de compensation pour les dommages ADNmt. Au contraire, une diminution du nombre de copies de l'ADNmt a été rapportée dans plusieurs types de tumeurs, y compris le sein, les reins, le foie, l'ovaire et les cancers gastriques, et il a été suggéré d'être associé à un risque accru de développement et de progression de la maladie. Le nombre de copies d'ADNmt peut dépendre de plusieurs facteurs, y compris le site de mutation dans le génome mitochondrial. Par exemple, des mutations dans la boucle D des mitochondries, qui contrôlent sa réplication peuvent donner lieu à nombre de copies diminué. À l'inverse, une augmentation du nombre de copies de l'ADNmt peut se produire comme une réponse adaptative à un dysfonctionnement mitochondrial ou due à des mutations dans des gènes nucléaires indirectement impliqués dans le contrôle du nombre de copies. Enfin, comme nous l'avons toujours pas identifié tous les facteurs qui participent à ce processus, la probabilité d'un mécanisme plus actif contrôlant ce nombre ne peut être négligée.

La réduction du nombre de copies de l'ADNmt dans les spermatozoïdes de mammifères est admise. Néanmoins, ce nombre, estimé par plusieurs études et pour différentes espèces, est extrêmement hétérogène.

En effet, **Hecht et al** ont montré, par densitométrie comparative après Southern-blot, une chute du nombre de copies d'ADNmt d'un facteur 10 entre les spermatocytes au stade pachytène et les spermatozoïdes prélevés au niveau de la queue de l'épididyme chez la souris. Ils ont évalué entre 25 et 75 le nombre de copies d'ADNmt dans ces spermatozoïdes (**Hecht et al., 1984**). Par la suite, une autre équipe, utilisant le ratio ADNmt/ADNr 18S apprécié après Southern-blot d'ADN de spermatozoïdes humains, ont estimé à 1500 le nombre de copies par spermatozoïde (**Manfredi et al., 1997**). **Shitara et al (2000)**, par PCR quantitative en temps réel, ont évalué à environ dix le nombre de copies d'ADNmt dans les spermatozoïdes contre 150 dans les spermatides de souris. Par la même technique, d'autres auteurs ont estimé, chez l'homme, le nombre de copies par spermatozoïde entre 7 et 70. La discordance entre les différents résultats de la littérature pourrait découler de l'hétérogénéité des techniques utilisées pour la quantification du génome mitochondrial.

En effet, les méthodes de Southern-blot employées par certains auteurs sont susceptibles d'entraîner des phénomènes d'hybridations croisées avec des pseudogènes mitochondriaux (environ 300) présents dans le génome nucléaire. Ces pseudogènes présentent une forte homologie avec les gènes de l'ADNmt et peuvent être reconnus par les sondes d'ADNmt telles que celles utilisées par les techniques de Southern-blot. Un autre facteur de discordance pourrait être la présence, dans les échantillons de spermés analysés, de cellules rondes. Ces cellules rondes sont soit des cellules de la lignée germinale reconnues pour contenir un taux d'ADNmt supérieur à celui des spermatozoïdes, soit des leucocytes contenant plusieurs centaines de copies d'ADNmt. La présence de ces cellules dans les fractions spermatiques étudiées conduirait à une surestimation importante du taux moyen d'ADNmt par spermatozoïde (**May-Panloup *et al.*, 2003**).

Cette différence du taux d'ADNmt pourrait s'expliquer de deux manières. La première hypothèse est qu'il existerait un phénomène de feed-back permettant de compenser une déficience de la chaîne respiratoire en augmentant le taux d'ADNmt. Ce phénomène compensatoire est en effet souvent observé en pathologie mitochondriale. La seconde hypothèse est qu'il existerait un trouble de la différenciation et de la maturation du sperme chez les hommes infertiles. De fait, le taux d'ADNmt est plus important chez les infertiles présentant au moins deux anomalies au spermogramme. Une réduction insuffisante du nombre de copies d'ADNmt pourrait ainsi survenir dans le cadre d'une altération de la spermatogenèse (**Szuhai *et al.*, 2001**).

Discussion générale

La fonction reproductive de l'homme constitue aujourd'hui le siège de nombreux enjeux de société, et tout ce qui la concerne est fortement médiatisé. Cependant, et malgré les percées scientifiques majeures, ses contours restent souvent flous, sa fréquence difficile à mesurer et ses causes nombreuses. Par ailleurs, elle s'inscrit dans un contexte mondial de diminution des naissances dans lequel il n'est toujours aisé de séparer l'infertilité, de la diminution volontaire due à des projets familiaux, mais aussi dans celui de l'augmentation de l'AMP et de l'âge des couples qui cherchent à procréer. Ainsi, il est généralement admis que la fréquence de l'infertilité se situe autour de 15 %, bien qu'elle puisse varier selon les populations ou les groupes de population (OMS, 2010 ; INSERM, 2011).

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle de facteurs génétiques dans la survenue d'infertilité masculine. D'abord cytogénétique (anomalies chromosomiques de nombre ou de structure) puis moléculaire (microdélétions du chromosome Y). Les premières études se sont tournées vers l'identification de mutations rares à forte pénétrance, dans des familles présentant une fréquence très élevée de sujets atteints ; cette approche « classique » de la génétique moléculaire a mis en exergue le rôle bien établi aujourd'hui de gènes tels qu'*AURKC*, *SPATA16*, *DPY19L2* et *NR5A1*. On considère, néanmoins, que la part attribuable à ces mutations dans l'étiologie génétique de l'infertilité masculine est très réduite. Bien que de nouvelles mutations à forte pénétrance puissent être découvertes pour expliquer la part restante, on peut considérer cependant comme plus probable l'existence de mécanismes polygéniques, mettant en jeu de nombreux allèles polymorphes, conférant chacun un risque faible. Cette vision polygénique permettrait d'expliquer la grande variabilité du risque d'un homme à l'autre qui dépendra en particulier du nombre d'allèles délétères présents.

On estime aujourd'hui que près de 12 % du génome humain est polymorphe (The International HapMap Consortium 2005, 2007, 2010). Les données récentes indiquent que notre code génétique subit, selon les individus, des variations bien plus importantes que ce que l'on croyait jusqu'ici. Un grand nombre d'entre elles ne seraient pas délétères. En revanche, d'autres le seraient et pourraient même jouer un rôle dans un nombre non négligeable de pathologies. Il reste maintenant à étudier la contribution de ce phénomène, d'une part dans les différences génétiques entre les individus et d'autre part dans la survenue de pathologies susceptibles de résulter de ces changements.

Même si l'on continue la quête des gènes candidats responsables d'infertilité masculine et la compréhension de leur mode d'action, peu à peu apparaît un nouveau plan d'exploration génétique.

Dans la première partie de cette thèse, différents polymorphismes génétiques chez l'homme, et leur retentissement possible sur la fertilité masculine, ont été étudiés. Ainsi, nous avons sélectionné pour chacun des gènes un variant considéré comme facteur de risque potentiel, pouvant contribuer à la sévérité d'un défaut de spermatogenèse affectant la production et/ou la différenciation. Nous avons porté notre attention sur les résultats obtenus lors du génotypage de notre cohorte infertiles-témoins et sur les analyses statistiques qui ont suivi. Nous avons présenté ainsi, dans un premier temps, les données pour chacun des polymorphismes pris isolément avec leur impact sur le risque d'infertilité masculine idiopathique évalué dans notre population d'étude.

En ce qui concerne le polymorphisme de longueur de répétition CAG du gène *POLG1*, l'un des plus controversé et débattu, sa signification biologique dans l'infertilité masculine reste incertaine bien que le génotype hétérozygote semble être associé dans notre étude avec le phénotype OATs. Ce travail suggère également que la *POLG1*, éventuellement en combinaison avec d'autres facteurs, peut jouer un rôle dans la régulation de nombre de copies de l'ADNmt dans les spermatozoïdes humains. Notre hypothèse de travail a été établie, en partie, sur le rôle central qu'occupe ce gène *POLG1* dans la génétique mitochondriale motivant ainsi notre choix d'étude. L'écart entre les fréquences génotypiques et alléliques des différents rapports est fréquemment observé pour les études génétiques d'association de type cas-témoins, la diversité réelle ainsi que le biais d'échantillonnage de la population d'étude peut expliquer la surestimation de la prédisposition conférée par un polymorphisme génétique supposé délétère. Dans le cas du polymorphisme CAG du gène *POLG1*, les deux conditions peuvent contribuer à cet écart observé. Une explication possible pourrait être que les polymorphismes avec des effets fonctionnels légers ne seraient d'une importance pathogène qu'en présence de facteurs environnementaux spécifiques qui s'ajoutent à un certain bagage génétique. Outre la différence de l'origine ethnique et géographique, d'autres facteurs liés à la population d'étude peuvent donner une autre explication plausible de la discordance.

Notre étude du variant T3801C du *CYP11A1* révèle que celui-ci n'est pas un facteur de risque pour l'infertilité masculine chez les hommes algériens, du moins dans notre cohorte d'infertiles. Les données suggèrent que l'association entre ce polymorphisme et l'infertilité masculine est modifiée par d'importantes interactions gène-gène et gène-environnement. En effet, la redondance des enzymes de détoxification et l'existence de plusieurs polymorphismes pour un même gène compliquent la détermination de la part réelle de la variation d'un seul de ces gènes dans le dysfonctionnement étudié.

De plus, les variants alléliques supposés délétères des gènes du CYP, le plus souvent, ne présentent un effet phénotypique qu'après exposition à des xénobiotiques susceptibles d'exacerber leurs effets potentiels.

Enfin, pour la *MTHFR*, les résultats de l'étude génétique révèlent que le variant A1298C n'est pas un facteur de risque majeur pour l'infertilité masculine dans notre population. Les résultats de cette étude s'étendent à d'autres antérieurs rapportés sur le polymorphisme C677T du même gène qui n'est pas aussi un facteur de risque pour l'infertilité masculine de la population algérienne. À notre connaissance, aucune étude des haplotypes *MTHFR* n'a examiné le rôle de l'effet combiné de ces deux polymorphismes (C677T et A1298C) sur l'infertilité masculine en Algérie. En fait, même s'il n'a pas été observé d'effet majeur des variants étudiés, leur impact sur le déroulement de la spermatogenèse n'est pas totalement exclu. En outre, la possibilité que ces polymorphismes dans le métabolisme des folates affectent un autre phénotype précis d'infertilité est bien réelle. Cela concernerait en particulier les individus présentant une instabilité chromosomique, car les folates sont clairement impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Skjelbred *et al.*, 2006). Pour confirmer cette hypothèse, il sera nécessaire d'étudier une large cohorte d'individus présentant ce type d'anomalie. L'influence des polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des folates pourrait varier d'une population à l'autre pour plusieurs raisons. À travers ces données, il apparaît clairement que le métabolisme des folates et de l'homocystéine sont impliqués dans la physiologie et la physio-pathologie de la fertilité masculine. Cependant, le faible effectif ainsi que l'absence de données sur le statut en folates dans ces études pourraient également expliquer ces résultats discordants. Les connaissances dans ce domaine sont encore lacunaires et nécessitent d'être approfondies par des études qui tiennent compte des facteurs nutritionnels, environnementaux et génétiques qui interfèrent avec ce métabolisme.

Les polymorphismes de ces gènes étudiés comme facteur de risque potentiel de l'infertilité masculine sont des éléments qui, pour la plupart, sont considérés à l'heure actuelle comme des cofacteurs présents également chez les hommes fertiles plutôt que de possibles acteurs spécifiques d'une spermatogenèse défectueuse. Ces variants génétiques par eux-mêmes seraient probablement capables d'induire des dommages relativement mineurs dans la production et/ou la fonction des spermatozoïdes, mais les effets de ces variants alléliques peuvent être aggravés par la présence d'autres cofacteurs génétiques ou environnementaux.

Les études d'association construites sur le modèle cas-témoins constituent un outil formidable en génétique et cela, en dépit du fait que les résultats rapportés ne sont pas toujours reproductibles et souvent discordants. Différents effets fondateurs pourraient ainsi expliquer ces associations contradictoires. Dans ce type d'études, plusieurs paramètres sont importants : la taille et la composition des populations étudiées (en particulier des populations de témoins), le type de polymorphisme (SNP ou de répétition), les techniques utilisées pour le mettre en évidence (PCR/digestion, séquençage ou autre), l'hétérogénéité phénotypique du dysfonctionnement, la variabilité interindividuelle des effets phénotypiques ainsi que les différences ethniques et géographiques contribuant aux variations génétiques. Tout cela sans compter avec les artefacts statistiques. D'autant que la grande majorité des journaux scientifiques aura plutôt tendance à ne publier que les résultats positifs des études d'associations, et refuser la publication de résultats négatifs, ce qui entraîne indéniablement un biais lors des méta-analyses (**Patterson et Cardon, 2005**).

Les résultats de plusieurs centaines d'études d'association entre des polymorphismes génétiques relativement fréquents dans la population générale et le risque de l'infertilité masculine ont été publiés durant ces dernières années. En dépit de cet effort considérable, le bilan des connaissances acquises est assez décevant ; à quelques exceptions près, les associations positives mises en évidence n'ont généralement pas été confirmées. La taille relativement faible des populations étudiées (généralement quelques centaines de cas) et de ce fait la puissance statistique insuffisante pour mettre en évidence des effets modestes (OR attendus inférieurs à 1,5), pourrait en partie expliquer la discordance des résultats. De plus, les effets phénotypiques des polymorphismes génétiques sont eux-mêmes modulés par d'autres facteurs génétiques ainsi que par des facteurs environnementaux. Cette interférence est un exemple important de l'interaction gène-environnement dans le développement phénotypique. Il est donc probable que certains polymorphismes n'entraînent une altération de la spermatogenèse ou un défaut de la fonction testiculaire qu'en présence d'un fond génétique particulier et/ou en présence de facteurs environnementaux favorisant.

Avec une taille limitée de l'échantillon, en particulier dans les groupes subdivisés, nos résultats ne permettent que des conclusions préliminaires sur l'impact des trois polymorphismes prospectés. Des investigations épidémiologiques et biochimiques poussées sont nécessaires pour valider ces résultats. D'autres enquêtes tenant compte des interactions gène-gène et gène-environnement sur d'autres polymorphismes peuvent être utiles pour clarifier, en partie, l'étiologie de l'infertilité masculine en Algérie.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons prospecté la part de la génétique mitochondriale, tant sur le versant qualitatif que quantitatif, dans les dysfonctionnements liés à l'infertilité masculine idiopathique.

Des progrès importants en matière de recherche ont été faits sur le rôle des mitochondries et son génome dans la reproduction humaine. À côté des altérations de gènes nucléaires fondamentalement impliquées dans l'infertilité masculine, il y a des preuves croissantes qui incriminent des anomalies de l'ADNmt dans la survenue de ce dysfonctionnement. En effet, des preuves substantielles ont associé des carences de la fertilité masculine, par altération du nombre et/ou la mobilité des spermatozoïdes, à des délétions ou des mutations ponctuelles de l'ADNmt. De plus, d'autres études ont montré une corrélation entre la qualité du sperme, particulièrement la mobilité, et de la fonctionnalité de la chaîne respiratoire dans les mitochondries du spermatozoïde. Il est largement admis aujourd'hui que certaines des caractéristiques spermatiques sont clairement dépendantes de la mitochondrie et de la phosphorylation oxydative. En revanche, le lien entre ADNmt et fertilité masculine semble beaucoup plus complexe. Si l'ADNmt est susceptible de déterminer d'emblée une fonctionnalité mitochondriale spermatique particulière, il n'est pas certain qu'à l'issue de la spermatogenèse l'ADNmt ait encore un rôle à jouer. Son destin semble être la destruction rapide assurant son absence de transmission au fil des générations. Dans ce cadre, il est d'une part logique qu'il ne subisse pas les phénomènes de maintenance permettant d'assurer son intégrité comme c'est le cas pour d'autres cellules de l'organisme et spécialement l'ovocyte. D'autre part, en accord avec ce que la bibliographie rapporte, il semble juste de croire qu'une spermatogenèse efficiente ait pour but de produire un spermatozoïde fécondant pratiquement dépourvu d'ADNmt (**May-Panloup *et al.*, 2003**). Les mécanismes moléculaires à l'origine des altérations qualitatives et/ou quantitatives du génome mitochondrial sont encore controversés. L'hypothèse principale avancée pour expliquer l'accumulation de mutations dans l'ADNmt serait un stress oxydatif due principalement à la formation de la 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine (8-OHdG) et d'autres produits du dommage oxydant ce qui pourrait être impliqué dans la génération de délétions et d'autres mutations (**Hayakawa *et al.*, 1993**).

Il y a une sensibilité particulière de l'ADNmt à un stress oxydatif car, pour rappel, la molécule d'ADNmt est accolée à la membrane interne et donc proche de la chaîne respiratoire, elle n'est pas protégée par les histones et les capacités de réparation sont limitées comparées à l'ADN nucléaire. Ainsi, les EROs produits par les mitochondries provoquent des mutations ponctuelles et de nombreuses délétions responsables de perturbations dans le fonctionnement mitochondrial.

Le résultat final est une accumulation irréversible sur le long terme de dommages sur l'ADNmt qui peut être la cause principale de changements nuisibles observés dans l'organisme. Cela peut constituer une étiologie possible à des infertilités masculines idiopathiques.

Il serait intéressant de faire le lien entre génétique nucléaire, explorée précédemment par des études d'association cas-témoins, et génétique cytoplasmique dont le support est l'ADNmt. Partant de l'hypothèse qu'un excès d'EROs est à l'origine d'altérations du génome mitochondrial, il est évident que cet excès pourra être induit par un polymorphisme des gènes de détoxification à l'instar de *CYP1A1* qui code pour une des CYPs principales de la phase I d'activation des HAPs auxquels on est largement exposé de par notre environnement.

De plus, un ensemble de mécanismes comprenant la synthèse accrue de cytokines inflammatoires, la disponibilité réduite de l'oxyde nitrique, la génération excessive de radicaux libres, un stress du réticulum endoplasmique ont été mis en évidence dans des modèles cellulaires dans un contexte de carence en folates qui pourrait, en partie, être accentuée par un polymorphisme délétère de la *MTHFR* tel que le A1298C (**Austin et al., 2004**). Ces mêmes mécanismes existent également dans les gonades humaines, mais la relation causale avec le métabolisme des folates n'a pas encore été démontrée jusqu'à présent (**Forges et al., 2008**).

L'association entre une carence en folates et l'infertilité masculine peut être expliquée par le fait que des changements dans le statut des folates pourraient affecter la spermatogenèse en provoquant l'hypométhylation de l'ADN et induire une mauvaise incorporation d'uracile au cours de sa synthèse ce qui conduit à des erreurs de réparation, la rupture des brins ainsi que des anomalies chromosomiques. L'hypométhylation des cellules germinales pré-méiotiques chez la souris a démontré que ce processus inhibe leur différenciation en spermatozoïdes, il est possible que la variation d'activité de la *MTHFR* chez l'homme provoque l'infertilité par le même mécanisme (**Lee et al., 2006 ; Gava et al., 2011**). Ce même mécanisme pourrait être à l'origine d'une défaillance des mécanismes de réplication ou de réparation de l'ADNmt. De plus, la régulation du pool des dNTP mitochondriaux serait également un élément important du contrôle de la réplication de l'ADNmt. La mitochondrie ne possédant pas d'activité ribonucléotidyl transférase, les dNTP mitochondriaux proviennent du pool cytosolique dont la régulation est tributaire de l'activité de la *MTHFR*.

Le nombre de copies d'ADNmt peut dépendre de plusieurs facteurs y compris le site de mutation dans le génome mitochondrial. Par exemple, des mutations dans la boucle D des mitochondries, qui contrôlent la réplication de l'ADNmt, peut donner lieu à un nombre de copies diminué. À l'inverse, une augmentation du nombre de copies de l'ADNmt peut se produire comme une réponse adaptative à un dysfonctionnement mitochondrial ou suite à des mutations dans des gènes nucléaires, tels que *POLG1*, impliqués dans le contrôle du nombre de copies de l'ADNmt. Cependant, la probabilité de l'existence d'un mécanisme plus actif contrôlant le nombre de copies d'ADNmt ne peut être négligée, comme nous l'avons toujours pas clairement identifié tous les facteurs qui participent à ce processus.

En effet, il semblerait que les relations entre fertilité et génomes concernent également les modifications épigénétiques. Bien qu'elles n'altèrent pas la séquence de l'ADN, ces modifications épigénétiques peuvent affecter l'expression des gènes. Il peut s'agir d'une méthylation de l'ADN ou d'histones. Récemment quelques études ont suggéré une relation entre l'infertilité et des modifications épigénétiques qui peuvent survenir après exposition à des facteurs environnementaux. Du fait de l'implication de la *MTHFR* dans les processus de méthylation, on peut légitimement s'interroger sur l'impact potentiel d'un polymorphisme de ce gène sur le déroulement de ces modifications épigénétiques.

Ces dernières années, il a été constaté une baisse générale de la fertilité masculine avec des variations géographiques/ethniques confirmant l'existence de facteurs environnementaux et génétiques. Les interactions entre les gènes et l'environnement sont complexes et encore loin d'être élucidées. S'ajoute à l'effet génétique classique, des facteurs génétiques cytoplasmiques représentés par le génome mitochondrial

Nous venons de voir que l'infertilité masculine idiopathique reste un dysfonctionnement biologique complexe, dans le sens où de nombreux facteurs peuvent être impliqués, notamment des facteurs génétiques et environnementaux intimement mêlés.

**Conclusion
et
Perspectives**

Nous avons voulu, à travers ce travail, apporter notre modeste contribution sur des interrogations relatives aux causes génétique de l'infertilité masculine en Algérie. Historiquement, de par le monde, c'est le versant féminin de l'infertilité qui a été exploré en premier, les recherches sur la fertilité masculine sont plus récentes et moins développées. Aujourd'hui, la surveillance de la fertilité masculine et surtout la compréhension des facteurs d'infécondité sont d'autant plus d'actualité que de nombreuses publications internationales ont souligné une détérioration alarmante des paramètres spermatiques dans les pays industrialisés suggérant fortement l'implication de facteurs environnementaux.

De plus, la fréquence élevée des infertilités suggère qu'il ne s'agit pas d'un dysfonctionnement mono-factoriel, mais bien multi-factoriel, comme le montrent les nombreux gènes précédemment cités ; une prédisposition génétique est probablement impliquée. Des études de type cas/témoin ont été entreprises et les résultats sur l'implication de certains gènes sont encourageants. La connaissance des causes génétiques et la découverte de nouveaux gènes impliqués dans l'infertilité masculine est primordial pour une meilleure compréhension de son étiologie qui demeure pour la plupart des cas inconnue.

Les mitochondries, caractérisées pour leur fonction dans le métabolisme cellulaire énergétique, jouent également un rôle déterminant dans d'autres processus biologiques. Leur implication dans la reproduction humaine est une notion relativement récente qui suscite un intérêt scientifique et médical croissant. En effet, des altérations du métabolisme mitochondrial ont été associées à une baisse de la fertilité masculine. La présence dans le génome mitochondrial d'altérations qualitatives et/ou quantitatives constitue aujourd'hui une étiologie possible à une infertilité masculine idiopathique. De plus, ces altérations peuvent être conditionnées par des facteurs génétiques nucléaires et environnementaux.

Après la réalisation de notre travail de recherche et l'intégration des données scientifiques disponibles sur cette thématique, il paraît évident que la majorité des infertilités masculines dites "idiopathiques" ne sont ni le résultat de l'effet d'une exposition environnementale isolée, ni celui d'une mutation génétique unique, ni le résultat d'un ou de plusieurs polymorphismes supposés délétères mais sont, le plus souvent, dues à de nombreux facteurs de risque génétiques et environnementaux dont les effets peuvent se conjuguer de différentes manières. De plus, la découverte de l'implication de la mitochondrie et les altérations de son génome dans ces processus va permettre d'intégrer une nouvelle dimension dans la démarche de recherche d'une étiologie évidente. Ce travail de thèse nous permet d'apporter des éléments de preuve supplémentaires quant à la base mitochondriale des infertilités masculines.

Il nous paraît utile d'affirmer aujourd'hui que le dysfonctionnement étudié dépend d'interactions régulatrices complexes entre facteurs génétiques nucléaires, génétiques cytoplasmiques et environnementaux. Définir la contribution relative de chacune de ces composantes reste un défi scientifique important dans la recherche.

De ces données naissent des possibilités d'amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients infertiles. Actuellement, les progrès constants des techniques d'AMP permettent déjà d'outrepasser les barrières naturelles d'une fécondation par un sperme déficient mais soulèvent le problème de la transmission du facteur génétique causal à la descendance.

Enfin, avec le développement des nouvelles technologies et la possibilité de séquencer tout le génome, cela nous permettra d'identifier de nombreuses modifications de séquence. L'étape de validation de ces anomalies par des études fonctionnelles sera donc fondamentale afin de faire la distinction entre un simple polymorphisme génétique et une mutation délétère. L'utilisation des nouvelles techniques de génotypage de l'ensemble du génome qui ont permis des avancées considérables au cours des dix dernières années, sont maintenant supplantées par les nouvelles technologies de séquençage haut débit qui permettent désormais de séquencer la totalité des parties codantes d'un individu, en quelques jours, pour un coût raisonnable. L'application de ces techniques au séquençage du génome nucléaire et mitochondrial va permettre dans les années à venir de mieux caractériser la piste génétique.

Références bibliographiques

1. **ADALI A C.** 2011. Analysis of cytochrome P4501A1 genetic polymorphisms in patients with ischemic stroke. *Thèse en ligne : Université technique du Moyen-Orient, Ankara-Turquie.* Pagination multiple.
2. **AFSSET-INSERM.** 2008. Cancer et environnement (rapport d'expertise collective). *Les éditions Inserm-Paris.* 889 p. ISBN : 2-8559-8868-3.
3. **AHMADI A.** 1997. Sperm head decondensation, pronuclear formation, cleavage and embryonic development following intracytoplasmic injection of mitochondria damaged sperm in mammals. *Zygote.* 5 : 247-53.
4. **AITKEN R J.** 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development.* 7 : 659-68.
5. **AKCHICHE N.** 2006. Conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la différenciation cellulaire, la survie et la neuroplasticité : approches mécanistiques *in vitro* sur des lignées neuronales. *Thèse en ligne : Université Henri Poincaré, Nancy I.* Pagination multiple.
6. **AKNIN-SEIFER I E, TOURAINE R L, LEJEUNE H et al.** 2005. Is the CAG repeat of mitochondrial DNA polymerase gamma (POLG) associated with male infertility ? A multi-centre French study. *Human Reproduction.* 20 : 736-40.
7. **ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J et al.** 2002. *Molecular Biology of the Cell.* 4^{ème} édition. *Garland Science, New York.* ISBN : 0-8153-3218-1.
8. **ALCIVAR A A, HAKE L E, MILLETTE C F et al.** 1989. Mitochondrial gene expression in male germ cells of the mouse. *Developmental Biology.* 135(2) : 263-71.
9. **AMARAL A, RAMALHO-SANTOS J, ST JOHN J C et al.** 2007. The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Human Reproduction.* 22 : 1585.
10. **AMARAL A, LOURENCO B, MARQUES M et al.** 2013. Mitochondria functionality and sperm quality. *Society for Reproduction and Fertility.* 146 : 163-174.
11. **ANDERSON S, BANKIER A T, BARRELL B G et al.** 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290 : 457-65.
12. **ANDERSON S et KURLAND C G.** 1998. Ancient and recent horizontal transfer events: the origins of mitochondria. *APMIS Suppl.* 84 : 5-14.
13. **ANDERSON S, ZOMORODIPOUR A, ANDERSSON J O et al.** 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature.* 396(6707) : 133-40.
14. **ANDREWS R M, KUBACKA I, CHINNERY P F et al.** 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics.* 23 : 147.
15. **ANDROUTSOPOULOS V P, TSATSAKIS A M, SPANDIDOS D A.** 2009. Cytochrome P450 *CYP11A1*: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer.* 9 : 187.
16. **ARGAWAL A, DEEPINDER F, COCUZZA M et al.** 2007. Efficacy of varicocelectomy in improving semen parameters: new meta-analytical approach. *Urology.* 70 : 532-8.
17. **AUSTIN R C, LENTZ S R, WERSTUCK G H.** 2004. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death & Differentiation.* 11(Suppl. 1) : S56-64.
18. **AYDOS S E, TASPINAR M, SUNGUROGLU A et al.** 2009. Association of *CYP11A1* and glutathione S-transferase polymorphisms with male factor infertility. *Fertility and Sterility.* 92 : 541-547.

19. **BACHTROG D.** 2013. Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nature Genetics*. 14(2) : 113-24.
20. **BADAL S et DELGODA R.** 2014. Role of the modulation of *CYP11A1* expression and activity in chemoprevention. *Journal of Applied Toxicology*. 34 : 743-753.
21. **BAKLOUTI-GARGOURI S, GHORBEL M, CHAKROUN N et al.** 2012. The CAG repeat polymorphism of mitochondrial polymerase gamma (POLG) is associated with male infertility in Tunisia. *Andrologia*. 44(1) : 68-73.
22. **BALLINGER S W, SHOFFNER J M, WALLACE D C.** 1994. Mitochondrial myopathies: genetic aspects. *Current Topics in Bioenergetics*. 17 : 59-98.
23. **BANDELT H J, QUINTANA-MURCI L, SALAS A et al.** 2002. The fingerprint of phantom mutations in mitochondrial DNA data. *The American Journal of Human Genetics*. 71(5) : 1150-60.
24. **BARRITT J A, KOKOT M, COHEN J et al.** 2002. Quantification of human ooplasmic mitochondria. *Reproductive BioMedicine Online*. 4 : 243-247.
25. **BARTSCH H et NAIR U.** 2000. Genetic polymorphisms of *CYP* genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 9 : 3-28.
26. **BAUGHMAN J M, PEROCCHI F, GIRGIS H S et al.** 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 476 : 341-345.
27. **BENTIVOGLIO G, MELICA F, CRISTOFORONI P.** 1993. Folinic acid in the treatment of human male infertility. *Fertility and Sterility*. 60 : 698-701.
28. **BERTHAUT I, RAVEL C, FRAPSAUCE C et al.** 2008. Cancer et procréation chez l'homme. *Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie*. 10(4) : 255-264.
29. **BEZOLD G, LANGE M, PETER R U.** 2001. Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility. *The New England Journal of Medicine*. 344 : 1172-3.
30. **BHASIN S.** 2007. Approach to the infertile man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 92(6) : 1995-2004.
31. **BOGENHAGEN D F, ROUSSEAU D, BURKE S.** 2008. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *The Journal of Biological Chemistry*. 283(6) : 3665-3675.
32. **BOIVIN J, BUNTING L, COLLINS J A et al.** 2007. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*. 22 : 1506-12.
33. **BOLDEN A, NOY G P, WEISSBACH A.** 1977. DNA polymerase of mitochondria is a gamma-polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*. 252 : 3351-6.
34. **BONDE J P, JOFFE M, APOSTOLI P et al.** 2002. Sperm count and chromatin structure in men exposed to inorganic lead: lowest adverse effect levels. *Occupational and Environmental Medicine*. 59 : 234-242.
35. **BÖTTIGER A.** 2008. Genetic Variation in the Folate Receptor- α and *MTHFR* Genes as Determinants of Plasma Homocysteine Concentrations. *Thèse en ligne : Université d'Örebro-Suède*. Pagination multiple.
36. **BOURCIGAUX N, CHRISTIN-MAITRE S.** 2008. Dosages hormonaux chez l'homme infertile. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 36 : 551-556.

37. **BOURGERON T, RUSTIN P, CHRETIEN D et al.** 1995. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature Genetics*. 11(2) : 144-9.
38. **BOWLES J et KOOPMAN P.** 2010. Sex determination in mammalian germ cells: extrinsic versus intrinsic factors. *Reproduction*. 139 : 943-958.
39. **BOXMEER J C, SMIT M, WEBER R F et al.** 2007. Seminal plasma cobalamin significantly correlates with sperm concentration in men undergoing IVF or ICSI procedures. *Journal of Andrology*. 28 : 521-7.
40. **BROOKES P S, YOON Y, ROBOTHAM J L et al.** 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 287 : C817-833.
41. **BROWN M B et FORSYTHE A B.** 1974. The small sample behavior of some statistics which test the equality of several means. *Technometrics*. 16 : 129-132.
42. **BRUSCO A, MICHIELOTTO C, GATTA V et al.** 2006. The polymorphic polyglutamine repeat in the mitochondrial DNA polymerase gamma gene is not associated with oligozoospermia. *Journal of Endocrinological Investigation*. 29 : 1-4.
43. **BRZAKOWSKIA M, LOURDELA E, CABRYB R et al.** 2009. Épidémiologie du couple infertile. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. 38(Hors-série 1) : F3-F7.
44. **BUSTIN S A, BENES V, GARSON J A et al.** 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 55 : 611-622.
45. **CALLEN J C et PERASSO P.** 2005. Biologie cellulaire : des molécules aux organismes. 2^{ème} édition. Collection Sciences-Sup. *Dunod, Paris*. ISBN : 2-1004-9236-5.
46. **CALVO S, JAIN M, XIE X et al.** 2006. Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nature Genetics*. 38(5) : 576-582.
47. **CANN R L, STONEKING M, WILSON A C.** 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*. 325(6099) : 31-6.
48. **CARLSEN E, GIWERCMAN A, KEIDING N et al.** 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal*. 305 : 609-13.
49. **CASCORBI I, BROCKMÖLLER J, ROOTS I.** 1996. A C4887A polymorphism in exon 7 of human *CYP1A1*: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Research*. 56 : 4965-4869.
50. **CATALA M.** 2006. Embryologie : Développement précoce chez l'humain. 3^{ème} édition. *Elsevier/Masson*. 230p. ISBN : 2-2940-1109-0.
51. **CHABROL B D L.** 2001. Maladies métaboliques héréditaires. *Éditions Doin*. 231p. ISBN : 2-7040-1293-8
52. **CHAGNON P, GEE M, FILION M et al.** 1999. Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome indicates significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French Canadian founder population. *American Journal of Medical Genetics*. 85(1) : 20-30.
53. **CHELLAT D, REZGOUNE M L, HAMANE D et al.** 2012. Influence of *MTHFR* C677T gene polymorphisms in Algerian infertile men with azoospermia or severe oligozoospermia. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 16(8) : 874-8.

54. CHEN W C, KANG XX, HUANG Z S *et al.* 2010. *CYP11A1* gene polymorphism in oligozoospermic infertile patients of Zhuang population in Guangxi area. *Guangdong Medical Journal*. 31(13) : 1669-1671.
55. CHEN Z, KARAPLIS A C, ACKERMAN S L *et al.* 2001. Mice deficient in MTHFR exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Human Molecular Genetics*. 10 : 433-43.
56. CHINNERY P F *et HUDSON G.* 2013. Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin*. 106 : 135-59.
57. CLAYTON D A *et ROBBERSON D L.* 1972. Replication of mitochondrial DNA in mouse L cells and their thymidine kinase - derivatives: displacement replication on a covalently-closed circular template. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS-USA)*. 69(12) : 3810-3814.
58. COMHAIRE F. 2010. The role of food supplementation in the treatment of the infertile couple and for assisted reproduction. *Andrologia*. 42(5) : 331-340.
59. COPELAND W C. 2012. Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 47 : 64-74.
60. CORCHERO J, PIMPRALE S, KIMURA S *et al.* 2001. Organization of the *CYP11A* cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics*. 11 : 1-6.
61. COUTTON C, SATRE V, ARNOULT C *et al.* 2012. Génétique de l'infertilité masculine : les nouveaux acteurs. *Médecine/Sciences*. 28 : 513-8.
62. CRAM D S, OSBORNE E, MCLACHLAN R I. 2006. Y chromosome microdeletions: implications for assisted conception. *Medical Journal of Australia*. 185(8) : 433-4.
63. CRIMI M, DEL-BO R, GALBIATI S *et al.* 2003. Mitochondrial A12308G polymorphism affects clinical features in patients with single mtDNA macrodeletion. *European Journal of Human Genetics*. 11(11) : 896-898.
64. CROFTS F, COSMA G N, CURRIE D *et al.* 1993. A novel *CYP11A1* gene polymorphism in African-Americans. *Carcinogenesis*. 14 : 1729-31.
65. CUMMINS J. 1998. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Reviews of Reproduction*. 3(3) : 172-82.
66. DE BRAEKELEER M, PERRIN A, MOREL F. 2006. Chromosomal abnormalities in male infertility. *Transworld Research Network, Trivandrum*. (India) : 27-527.
67. DE SOUSA R T, UNO M, ZANETTI M V *et al.* 2013. Leukocyte mitochondrial DNA copy number in bipolar disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 3(48) : 32-5.
68. DERIAS E M B, STEFANIS P, DRAKELEY A *et al.* 2006. Growing concern over the safety of using mobile phones and male fertility. *Archives of Andrology*. 52 : 9-14.
69. DHILLON V S, SHAHID M, HUSAIN S A *et al.* 2007. Associations of *MTHFR DNMT3b* 4977 bp deletion in mtDNA and *GSTM1* deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of *GSTM1* in non-obstructive infertility in Indian men. *Molecular Human Reproduction*. 13 : 213-222.
70. DIEZ-SANCHEZ C, RUIZ-PESINI E, LAPENA A C *et al.* 2003. Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 68(1) : 180-5.
71. DIMAURO S, SCHON E A. 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *The New England Journal of Medicine*. 348(26) : 2656-68.

72. DIMAURO S. 2004. Mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1658 : 80-8.
73. DUMUR V, GERVAIS R, RIGOT J M et al. 1990. Abnormal distribution of $\Delta F508$ allele in azoospermic men with congenital aplasia of the epididymis and vas deferens. *The Lancet*. 336(8713) : 512.
74. DUZCAN F, AYBEK Z, TEPELI E et al. 2006. Sex chromosome aneuploidy rates in the somatic cells of infertile men. *The Journal of Reproductive Medicine*. 51(6) : 489-92.
75. Ebisch I M, Pierik F H, DE Jonk F H et al. 2006. Does folic acid and zinc sulphate intervention effect endocrine parameters and sperm characteristics in men ?. *International Journal of Andrology*. 29 : 339-45.
76. ELOUALID A, ABIDI O, CHARIF M et al. 2012. Association of the *MTHFR* A1298C Variant with Unexplained Severe Male Infertility. *PLoS One*. 7(3) : e34111.
77. Esakky P, Hansen D A, Drury A M et al. 2012. Cigarette smoke condensate induces aryl hydrocarbon receptor dependent changes in gene expression inspermatocytes. *Reproductive Toxicology*. 34(4) : 665-76.
78. FALKENBERG M, LARSSON N G, GUSTAFSSON C M. 2007. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*. 76 : 679-99.
79. FANG J, WANG S, WANG H et al. 2014. The *CYP11A1* gene polymorphisms and idiopathic male infertility risk: A meta-analysis. *Gene*. 535(2014) : 93-96.
80. FAURE A. 2007. Exploration du génome et de l'épigénome dans les troubles sévères de la spermatogenèse chez l'homme. *Thèse en ligne : Université Joseph Fourier - Grenoble 1*. Pagination multiple.
81. FERLIN A, MORO E, ROSSI A et al. 2003. The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *Journal of Medical Genetics*. 40(1) : 18-24.
82. FERLIN A, ARREDI B, FORESTA C et al. 2006. Genetic causes of male infertility. *Reproductive Toxicology*. 22 : 133-141.
83. FLORENTZ C, SOHM B, TRYOEN-TOTH P et al. 2003. Human mitochondrial tRNAs in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60 : 1356-1375.
84. FODE M, KROGH-JESPERSEN S, BRACKETT N L et al. 2012. Male sexual dysfunction and infertility associated with neurological disorders. *Asian Journal of Andrology*. 14 : 61-68.
85. FOLGERO T, BERTHEUSSEN K, LINDAL S et al. 1993. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Human Reproduction*. 8(11) : 1863-8.
86. FORGES T, PELLANDA H, DILIGENT C et al. 2008. Do folates have an impact on fertility ? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 36(9) : 930-9.
87. FOWLER B. 2005. Homocysteine : overview of biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Seminars in Vascular Medicine*. 5(2) : 77-86.
88. FRITSCH E, SCHUPPE H C, DÖHR O et al. 1998. Increased frequencies of *CYP11A1* polymorphisms in infertile men. *Andrologia*. 30(3) : 125-8.
89. FROSST P, BLOM H J, MILOS R et al. 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in *MTHFR*. *Nature Genetics*. 10 : 111-113.
90. GABALDON T et HUYNEN M A. 2004. Shaping the mitochondrial proteome. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1659 : 212-220.

91. **GARNER L.** 2012. The Effects of 5,10-MTHFR Deficiency and Methionine Supplementation on the DNA Methylation Patterns of Early Male Germ Cells. *Thèse en ligne : Université de Montréal-Canada*. Pagination multiple.
92. **GAUGHAN D J, BARBAUX S, KLUIJTMANS L A et al.** 2000. The human and mouse *MTHFR* genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the *CLCN6* gene. *Gene*. 257 : 279-289.
93. **GAVA M M, CHAGAS-EDE O, BIANCO B et al.** 2011. *MTHFR* polymorphisms are related to male infertility in Brazilian men. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 15 : 153-157.
94. **GEORGELLIS A, TOPPARI J, VEROMAA T et al.** 1990. Inhibition of meiotic divisions of rat spermatocytes *in vitro* by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research*. 231 : 125-35
95. **GLEASON C, HUANG S, THATCHER L F et al.** 2011. Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS-USA)*. 108 : 10768-10773.
96. **GNAIGER E.** 2005. Oxygen conformation of cellular respiration. A perspective of mitochondrial physiology. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 543 : 39-55.
97. **GOTTLIEB B, BEITEL L K, WU J H et al.** 2004. The androgen receptor gene mutations database (ARDB) : 2004 update. *Human Mutation*. 23 : 527-33.
98. **GOYETTE P, FROSST, P, ROSENBLATT D S et al.** 1995. Seven novel mutations in the *MTHFR* gene and genotype/phenotype correlations in severe *MTHFR* deficiency. *The American Journal of Human Genetics*. 56 : 1052-1059.
99. **GRAVES J A, KOINA E, SANKOVIC N.** 2006. How the gene content of human sex chromosomes evolved. *Current Opinion in Genetics & Development*. 16 : 219-24.
100. **GRAY M W, BURGER G, LANG B F et al.** 2001. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biology*. 2(6) : 1018.
101. **GRIMM S et BRDICZKA D.** 2007. The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis*. 12 : 841-855.
102. **GRUNEWALD S, KRIEGEL C, BAUMANN T et al.** 2009. Interactions between apoptotic signal transduction and capacitation in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 24 : 2071-8.
103. **GUEANT-RODRIGUEZ R M, JUILLIERE Y, CANDITO M et al.** 2005. Association of *MTRRA66G* polymorphism (but not of *MTHFR C677T* and *A1298C*, *MTRA2756G*, *TCN C776G*) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thrombosis and Haemostasis*. 94 : 510-5.
104. **GUPTA N, SARKAR S, DAVID A et al.** 2013. Significant impact of the *MTHFR* polymorphisms and haplotypes on male infertility risk. *PLoS One*. 8(7) : e69180.
105. **GUY L et VÉDRINE N.** 2008. Exploration clinique et paraclinique du testicule. *Encyclopédie Médico Chirurgicale (EMC)*. 18-601-C-10.
106. **HANCOCK J M, WORTHEY E A, SANTIBÁÑEZ-KOREF M F.** 2001. A role for selection in regulating the evolutionary emergence of disease-causing and other coding CAG repeats in humans and mice. *Molecular Biology and Evolution*. 18(6) : 1014-23.
107. **HARMAN D.** 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *The Journals of Gerontology*. 11(3) : 298-300.

108. **HARPER H A, GRANNER D K, MURRAY R K et al.** 2013. Biochimie de Harper. *Edition De Boeck Supérieur, Bruxelles*. 848p. ISBN : 2-8041-7561-8.
109. **HARRIS T P, GOMAS K P, WEIR F et al.** 2006. Molecular analysis of polymerase gamma gene and mitochondrial polymorphism in fertile and subfertile men. *International Journal of Andrology*. 29 : 421-33.
110. **HAYAKAWA M, SUGIYAMA S, HATTORI K et al.** 1993. Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 119 : 95-103.
111. **HAYASHI S I, WATANABE J, NAKACHI K et al.** 1991. PCR detection of an A/G polymorphism within exon 7 of the *CYP11A1* gene. *Nucleic Acids Research*. 19 : 4797.
112. **HE Y, GONG Y, GU J et al.** 2014. Increased leukocyte mitochondrial DNA copy number is associated with oral premalignant lesions: an epidemiology study. *Carcinogenesis*. 35(8) : 1760-4.
113. **HE Y, TANG J, LI Z et al.** 2014. Leukocyte mitochondrial DNA copy number in blood is not associated with major depressive disorder in young adults. *PLoS One*. 9(5) : e96869.
114. **HECHT N B, LIEM H, KLEENE K C et al.** 1984. Maternal inheritance of the mouse mitochondrial genome is not mediated by a loss or gross alteration of the paternal mitochondrial DNA or by methylation of the oocyte mitochondrial DNA. *Developmental Biology*. 102(2) : 452-61.
115. **HEDGER M P et WINNALL W R.** 2012. Regulation of activin and inhibin in the adult testis and the evidence for functional roles in spermatogenesis and immunoregulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 359(1-2) : 30-42.
116. **HEID C A, STEVENS J, LIVAK K J et al.** 1996. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*. 6 : 986-994.
117. **HERMO L, PELLETIER R M, CYR D G et al.** 2010. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy Research and Technique*. 73 : 241-278.
118. **HERRMANN J M et NEUPERT W.** 2000. Protein transport into mitochondria. *Current Opinion in Microbiology*. 3(2) : 210-214.
119. **HIGUCHI R, DOLLINGER G, WALSH P S et al.** 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nature Biotechnology*. 10 : 413-417.
120. **HIGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G et al.** 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology*. 11 : 1026-1030.
121. **HOFMANN J N, HOSGOOD H D, LIU C S et al.** 2014. A nested case-control study of leukocyte mitochondrial DNA copy number and renal cell carcinoma in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. *Carcinogenesis*. 35(5):1028-31.
122. **HOFMANN S, JAKSCH M, BEZOLD R et al.** 1997. Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease. *Human Molecular Genetics*. 6(11) : 1835-46.
123. **HOLLENBECK P J et SAXTON W M.** 2005. The axonal transport of mitochondria. *Journal of Cell Science*. 118 : 5411-9.
124. **HOLSCLAW D S, LOBER B, JOCKIN, H et al.** 1971. Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis. *Journal of Urology*. 106(4) : 568-74.
125. **HOLT I J, HARDING A E, MORGAN-HUGHES J A.** 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. 331 : 717-719.

126. **HOLT I J.** 2003. Genetics of mitochondrial diseases. *Oxford University Press, Oxford.* 374p. ISBN : 0-1985-0865-4.
127. **HOLYOAKE A J, SIN I L, BENNY P S et al.** 1999. Association of a novel human mtDNA *ATPase6* mutation with immature sperm cells. *Andrologia.* 31(6) : 339-45.
128. **HOUTEN S M et WANDERS R J A.** 2010. A general introduction to the biochemistry of mitochondria. *Journal of inherited metabolic disease.* 33(5) : 469-477.
129. **HOWELL N, KUBACKA I, MACKEY D A.** 1996. How rapidly does the human mitochondrial genome evolve ?. *The American Journal of Human Genetics.* 59 : 501-509.
130. **HUANG B, GAO Y T, SHU X O et al.** 2014. Association of leukocyte mitochondrial DNA copy number with colorectal cancer risk: Results from the Shanghai Women's Health Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 23(11) : 2357-65.
131. **HUANG C H, SU S L, HSIEH M C et al.** 2011. Depleted leukocyte mitochondrial DNA copy number in metabolic syndrome. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis.* 18(10) : 867-73.
132. **HUDSON G et CHINNERY P F.** 2006. Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Human Molecular Genetics.* 15 Spec No 2 : R244-52.
133. **HUYGHE E, IZARD V, RIGOT J M et al.** 2008. Évaluation de l'homme infertile : recommandations AFU 2007. *Progrès en urologie.* 18 : 95-101.
134. **HWANG K, YATSENKO A, JORGEZ C et al.** 2010. Mendelian genetics of male infertility. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1214 : E1-E17.
135. **IDELMAN S et VERDETTI J.** 2000. Endocrinologie et communications cellulaires (Collection Grenoble Sciences). *EDP Sciences, Paris.* 584 p. ISBN : 2-8688-3476-0 .
136. **INABA K.** 2007. Molecular basis of sperm flagellar axonemes: structural and evolutionary aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1101 : 506-26.
137. **INSERM.** 2011. Reproduction et environnement (rapport d'expertise collective). *Les éditions Inserm-Paris.* 713 p. ISBN: 978-2-85598-890.
138. **IZMIRLI M.** 2013. A literature review of *MTHFR* (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk. *Molecular Biology Reports.* 40(1) : 625-37.
139. **JANSEN R P S et BURTON G J.** 2004. Mitochondrial dysfunction in reproduction. *Mitochondrion.* 4 : 577-600.
140. **JENDRACH M, MAI S, POHL S et al.** 2008. Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion.* 8 : 293-304.
141. **JENSEN M, LEFFERS H, PETERSEN JH et al.** 2004. Frequent polymorphism of the mitochondrial DNA polymerase gamma gene (*POLG*) in patients with normal spermiograms and unexplained subfertility. *Human Reproduction.* 19 : 65-70.
142. **JENSEN M B, LEFFERS H, PETERSEN J H et al.** 2008. Association of the polymorphism of the CAG repeat in the mitochondrial DNA polymerase gamma gene (*POLG*) with testicular germ-cell cancer. *Annals of Oncology.* 19 : 1910-1914.
143. **JERUSS J F et WOODRUFF T K.** 2009. Preservation of fertility in patients with cancer. *The New England Journal of Medicine.* 360 : 902-911.
144. **JOHNS D R.** 1995. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. *The New England Journal of Medicine.* 333(10) : 638-44.

145. JUNG A et SCHUPPE H C. 2007. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrology*. 39 : 203-15.
146. KALLA NR, SAGGAR SK, PURI R et al. 1997. Regulation of male fertility by pyrimethamine in adult mice. *Research in Experimental Medicine*. 197 : 45-52.
147. KANN O et KOVACS R. 2007. Mitochondria and neuronal activity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 292 : C641-657.
148. KAO S H, CHAO H T, WEI Y H. 1995. Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biology of Reproduction*. 52(4) : 729-736.
149. KAO S H, CHAO H T, WEI Y H. 1998. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. 4(7) : 657-66.
150. KELLY T L et NEAGA O R. 2005. Infertility in 5,10-MTHFR deficient male mice is partially alleviated by lifetime dietary betaine supplementation. *Biology of Reproduction*. 72(3) : 667-677.
151. KIM J H, KIM H K, KO J H et al. 2013. The relationship between leukocyte mitochondrial DNA copy number and telomere length in community-dwelling elderly women. *PLoS One*. 8(6) : e67227.
152. KIM S Y, LIM J W, KIM J W et al. 2015. Association between genetic polymorphisms in folate-related enzyme genes and infertile men with non-obstructive azoospermia. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 21 : 1-7.
153. KIM Y H, HAIDL G, SCHAEFER M et al. 2007. Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece. *Developmental Biology*. 302(2) : 463-476.
154. KIRCHES E, MICHAEL M, WARICH-KIRCHES M et al. 2001. Heterogeneous tissue distribution of a mitochondrial DNA polymorphism in heteroplasmic subjects without mitochondrial disorders. *Journal of Medical Genetics*. 38 : 312-317.
155. KOMPARE M et RIZZO W B. 2008. Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Seminars in Pediatric Neurology*. 15(3) : 140-9.
156. KORHONEN J A, PHAM X H, PELLEGRINI M et al. 2004. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome *in vitro*. *The EMBO journal*. 23(12) : 2423-9.
157. KRAUSZ C et MCELREAVEY K. 2001. Y chromosome microdeletions in "fertile" males. *Human Reproduction*. 16(6) : 1306-7.
158. KRAUSZ C, GUARDUCCI E, BECHERINI L et al. 2004. The clinical significance of the *POLG* gene polymorphism in male infertility. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 89 : 4292-7.
159. KRAUSZ C. 2011. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 25 : 271-285.
160. KRISHNAN K J, REEVE A K, SAMUELS D C et al. 2008. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells ?. *Nature Genetics*. 40(3) : 275-9.
161. KRISTIENSEN W, HAUGEN T B, WITCZAK O et al. 2011. *CYP11A1*, *CYP3A5* and *CYP3A7* polymorphisms and testicular cancer susceptibility. *International Journal of Andrology*. 34(1) : 77-83.
162. KRUSKAL W H et WALLIS W A. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*. 47 : 583-621.

163. KUMAR R, VENKATESH S, KUMAR M *et al.* 2009. Oxidative stress and sperm mitochondrial DNA mutation in idiopathic oligoasthenozoospermic men. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 46(2) : 172-177.
164. KUNZLE R, MUELLER M D, HANGGI W *et al.* 2003. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertility and Sterility*. 79(2) : 287-291.
165. KURZAWSKI M, WAJDA A, MALINOWSKI D *et al.* 2015. Association study of folate-related enzymes (MTHFR, MTR, MTRR) genetic variants with non-obstructive male infertility in a Polish population. *Genetics and Molecular Biology*. 38(1) : 42-47.
166. LANGPING H, CHINNERY P F, DURHAM S E *et al.* 2002. Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 30(14) : e68.
167. LANZA I R *et al.* NAIR K S. 2010. Mitochondrial function as a determinant of life span. *European Journal of Physiology*. 459(2) : 277-289.
168. LARAQUI A, ALLAMI A, CARRIE A *et al.* 2006. Influence of methionine synthase (A2756G) and methionine synthase reductase (A66G) polymorphisms on plasma homocysteine levels and relation to risk of coronary artery disease. *Acta Cardiologica*. 61 : 51-61.
169. LARSEN N B, RASMUSSEN M, RASMUSSEN L J. 2005. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways ?. *Mitochondrion*. 5 : 89-108.
170. LARSSON N G *et al.* CLAYTON D A. 1995. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annual Review of Genetics*. 29 : 151-78.
171. LAWRENCE DE KONING A B, WERSTUCK G H, ZHOU J *et al.* 2003. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clinical Biochemistry*. 36 : 431-41.
172. LAX N Z, WHITTAKER R G, HEPPLWHITE P D *et al.* 2011. Sensory neuropathy in patients harbouring recessive polymerase gamma mutations. *Brain*. 135 : 62-71.
173. LECOMTE P *et al.* GERVAISE N. 2001. Troubles de la fertilité d'origine endocrinienne. *Endocrinologie-Nutrition; Encyclopédie Médico-chirurgicale*. 10-030-A-10.
174. LEE H C, JEONG Y M, LEE S H *et al.* 2006. Association study of four polymorphisms in three folate-related enzyme genes with non-obstructive male infertility. *Human Reproduction*. 21 : 3162-3170.
175. LEGROS F, MALKA F, FRACHON P *et al.* 2004. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *Journal of Cell Science*. 117 : 2653-2662.
176. LEREMIADOU F *et al.* RODAKIS G C. 2009. Correlation of the 4977 bp mitochondrial DNA deletion with human sperm dysfunction. *BMC Research Notes*. 2 : 18-18.
177. LESTIENNE P. 1987. Evidence for a direct role of the DNA polymerase gamma in the replication of the human mitochondrial DNA *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 146 : 1146-53.
178. LESTIENNE P *et al.* PONSOT G. 1988. Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion. *The Lancet*. 1(8590) : 885.
179. LESTIENNE P, REYNIER P, CHRETIEN MF *et al.* 1997. Oligoasthenospermia associated with multiple mitochondrial DNA rearrangements. *Molecular Human Reproduction*. 3 : 811-4.
180. LETELLIER T, HEINRICH R, MALGAT M *et al.* 1994. The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach. *Biochemical Journal*. 302 : 171-4.

181. LEVENE H. 1960. Contributions to Probability and Statistics. *Stanford University Press*. pp : 278-292.
182. LI S S, LI J, XIAO Z *et al.* 2014. Prospective study of *MTHFR* genetic polymorphisms as a possible etiology of male infertility. *Genetics and Molecular Research*. 13(3) : 6367-74.
183. LI Z, HAINES C J, HAN Y. 2008. Micro-deletions" of the human Y chromosome and their relationship with male infertility. *Journal of Genetics and Genomics*. 35(4) : 193-9.
184. LIU K, ZHAO R, SHEN M *et al.* 2015. Role of genetic mutations in folate-related enzyme genes on Male Infertility. *Scientific Reports*. 5 : 15548.
185. LIU M *et al.* SPREMULLI L. 2000. Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 : 29400-29406.
186. LIU S F, KUO H C, TSENG C W *et al.* 2015. Leukocyte Mitochondrial DNA Copy Number Is Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One*. 10(9) : e0138716.
187. LIU S Y, ZHANG C J, PENG H Y *et al.* 2011. CAG-repeat variant in the polymerase γ gene and male infertility in the Chinese population : a meta-analysis. *Asian Journal of Andrology*. 13 : 298-304.
188. LODISH H, BERK A, ZIPURSKY L *et al.* 2005. Biologie moléculaire de la cellule. *Edition De Boeck Université, Bruxelles*. 1096p. ISBN : 2-8041-4802-5.
189. LOMBES A, AURE K, BELLANNE-CHANTELOT C *et al.* 2013. Unsolved issues related to human mitochondrial diseases. *Biochimie*. 100 : 171-6.
190. LONGLEY M J, CLARK S, YU-WAI-MAN C *et al.* 2006. Mutant *POLG2* disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *The American Journal of Human Genetics*. 78 : 1026-34.
191. LOPEZ-TEIJON M, ELBAILE M M, ALVAREZ J G. 2008. Geographical differences in semen quality in a population of young healthy volunteers from the different regions of Spain. *Andrology*. 40(5) : 318-28.
192. LU N, WU B, XIA Y *et al.* 2008. Polymorphisms in *CYP11A1* gene are associated with male infertility in a Chinese population. *International Journal of Andrology*. 31(5) : 527-33.
193. LUFT R, IKKOS D, PALMIERI G *et al.* 1962. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *The Journal of Clinical Investigation*. 41 : 1776-804.
194. LUO H, LI H, YAO N, HU L *et al.* 2014. Association between 3801T.C Polymorphism of *CYP11A1* and Idiopathic Male Infertility Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 9(1) : e86649.
195. LUOMA P, MELBERG A, RINNE J O *et al.* 2004. Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations : clinical and molecular genetic study. *The Lancet*. 364 : 875-82.
196. LUOMA PT, EEROLA J, AHOLA S *et al.* 2007. Mitochondrial DNA polymerase gamma variants in idiopathic sporadic Parkinson disease. *Neurology*. 69 : 1152-1159.
197. MALM J, BIRN H, FROHM B *et al.* 2005. A minor fraction of a high-affinity folate binding protein from the epididymis is associated with membranous vesicles and spermatozoa in human semen. *International Journal of Andrology*. 28:267-74.
198. MANFREDI G, THYAGARAJAN D, PAPADOPOULOU L C *et al.* 1997. The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. *The American Journal of Human Genetics*. 61(4) : 953-60.

199. **MANNELLA C A**. 2006. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763(5-6) : 542-548.
200. **MARCELLI F, ROBINA G, RIGOTA J M**. 2009. Prise en charge de l'infertilité masculine. *Progrès en urologie*. 19 : 260-264.
201. **MARGULIS L**. Genetic and evolutionary consequences of symbiosis. *Experimental Parasitology*. 39(2) : 277-349.
202. **MAY-PANLOUP P, CHRÉTIEN M F, MALTHIÈRY Y et al**. 2004. Mitochondries et reproduction. *Médecine/Sciences*. 20 : 779-83.
203. **MAY-PANLOUP P, CHRETIEN MF, SAVAGNER F et al**. 2003. Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Human Reproduction*. 18(3) : 550-6.
204. **MAY-PANLOUP P, CHRÉTIEN M F, MALTHIÈRY Y et al**. 2006. ADN mitochondrial du spermatozoïde. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 34 : 847-854.
205. **MAYR CA, INGERSOLL R, WALLOCK LM et al**. 1999. Folate levels and the effects of folate deficiency in the reproductive organs of male rats. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 13 : A229.
206. **MEEKER J D, BARR D B, HAUSER R**. 2008. Human semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary metabolites of pyrethroid insecticides. *Human Reproduction*. 23 : 1932-1940.
207. **MESSAROS B M, ROSSANO M G, LIU G et al**. 2009. Negative effects of serum pp'-DDE on sperm parameters and modification by genetic polymorphisms. *Environmental Research*. 109(4) : 457-64.
208. **MFADY D S, SADIQ M F, KHABOUR O F et al**. 2014. Associations of variants in *MTHFR* and *MTRR* genes with male infertility in the Jordanian population. *Gene*. 536(1) : 40-4.
209. **MIEUSSET R, BUJAN L**. 1995. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *International Journal Of Andrology*. 18 : 169-184.
210. **MILLER S A, DYKES D D, POLESKY H F**. 1988. A Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16(3) : 1215.
211. **MIYAMOTO T, TSUJIMURA A, MIYAGAWA Y et al**. 2012. Male infertility and its causes in human. *Advances in Urology*. 2012 : 384520.
212. **MONTIEL-SOSA F, RUIZ-PESINI E, ENRIQUEZ J A et al**. 2005. Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages. *Gene*. 368 : 21-7
213. **MONTJEAN D, BENKHALIFA M, DESSOLLE L et al**. 2011. Polymorphisms in *MTHFR* and *MTRR* genes associated with blood plasma homocysteine concentration and sperm counts. *Fertility and Sterility*. 95 : 635-40.
214. **MOREL F, ROUX C, BRESSON J L et al**. 1999. Sex chromosome aneuploidies in sperm of 47,XYY men. *Archives of Andrology*. 43(1) : 27-36.
215. **MOREL F, DOUET-GUILBERT N, LE BRIS M J et al**. 2004. Chromosomal abnormalities in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection : A study of 370 couples and review of the literature. *International Journal of Andrology*. 27(3) : 178-82.
216. **MORENO R D et ALVARADO C P**. 2006. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Molecular Reproduction and Development*. 73(11) : 1430-4.

217. **MRUK D D et CHENG C Y.** 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews*. 25(5) : 747-806.
218. **MURAKAMI E, FENG J Y, LEE H et al.** 2003. Characterization of novel reverse transcriptase and other RNA-associated catalytic activities by human DNA polymerase gamma: importance in mitochondrial DNA replication. *The Journal of Biological Chemistry*. 278 : 36403-9.
219. **NACHMAN M W et CROWELL S L.** 2000. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics*. 156(1) : 297-304.
220. **NEEVE V C, SAMUELS D C, BINDOFF L A et al.** 2012. What is influencing the phenotype of the common homozygous polymerase- γ mutation p.Ala467Thr ?. *Brain*. 135(12) : 3614-26.
221. **NELSON D R, KOYMANS L, KAMATAKI T et al.** 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 6(1) : 1-42.
222. **NI W, HAIYAN L, AIHUA W, PEILI Z et al.** 2015. Lack of association between genetic polymorphisms in three folate-related enzyme genes and male infertility in the Chinese population. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 32 : 369-374.
223. **NISHIOKA K, VILARINO-GUELL C, COBB S A et al.** 2010. Genetic variation of the mitochondrial complex I subunit *NDUFV2* and Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 16 : 686-687.
224. **NOWAK R, ZUB R, SKONECZNA I et al.** 2005. CAG repeat polymorphism in the DNA polymerase {gamma} gene in a Polish population : an association with testicular cancer risk. *Annals of Oncology*. 16 : 1211-1212.
225. **OAKES C C, KELLY T L, ROBAIRE B et al.** 2007. Adverse effects of 5-aza-2'- deoxycytidine on spermatogenesis include reduced sperm function and selective inhibition of *de novo* DNA methylation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 322 : 1171-80.
226. **O'BRIEN T W.** 2003. Properties of human mitochondrial ribosomes. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. 55 : 505-513.
227. **OKAMOTO K et SHAW J M.** 2005. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annual Review of Genetics*. 39 : 503-536.
228. **OKO R et SUTOVSKY P.** 2009. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *Journal of Reproductive Immunology*. 83(1-2) : 2-7.
229. **OLTEAN S et BANERJEE R.** 2003. Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B12. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(23) : 20778-84.
230. **ORTIZ DE MONTELLANO P R.** 2004. Human Cytochrome P450 Enzymes : Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry. 3^{ième} édition. *Springer-Verlag, New York*. 689p. ISBN: 0-3064-8324-6.
231. **PAHIPA S S, RATHOD H, BRICENO I et al.** 1998. Age related somatic mitochondrial DNA deletions in bone. *Journal of Clinical Pathology*. 51 (2) : 117-120.
232. **PALTY R, SILVERMAN W F, HERSHFINKEL M et al.** 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS-USA)*. 107 : 436-441.
233. **PARK J H, LEE H C, JEONG Y M et al.** 2005. *MTHFR* C677T polymorphism associates with unexplained infertile male factors. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 22 : 361-368.

234. PATTERSON M et CARDON L. 2005. Replication publication. *PLoS One*. 3(9) : e327.
235. PELLATI D, MYLONAKIS I, BERTOLONI G et al. 2008. Genital tract infections and infertility. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*. 140 : 3-11.
236. PENG L, WANG G, JIAO H Y et al. 2012. Relationship between *CYP11A1* rs4646903 gene polymorphism and male infertility in Ningxia. *Journal of Ningxia Medical University*. 34(3) : 208-210.
237. PETERSEN C et SODER O. 2006. The sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone Research*. 66(4) : 153-61.
238. PLASESKI T, NOVESKI P, DIMITROVSKI C et al. 2007. CAG repeat polymorphism of the mitochondrial DNA polymerase gamma gene in macedonian infertile and fertile men. *Balkan Journal of Medical Genetics*. 10 : 37-42.
239. PONCELET C et SIFER C. 2011. Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. *Springer-Verlag France*. 693p. ISBN : 2-8178-0060-5.
240. POONGOTHAI J, GOPENATH T S, MANONAYAKI S. 2009. Genetics of human male infertility. *Singapore Medical Journal*. 50(4) : 336.
241. POPOV V, MEDVEDEV N I, DAVIES H A et al. 2005. Mitochondria form a filamentous reticular network in hippocampal dendrites but are present as discrete bodies in axons: a three-dimensional ultrastructural study. *Journal of Comparative Neurology*. 492 : 50-65.
242. PORTEOUS W K, JAMES A M, SHEARD P W et al. 1998. Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *European Journal of Biochemistry*. 257 : 192-201.
243. POULTON J, MACAULAY V, MARCHINGTON D R. 1998. Mitochondrial genetics '98 is the bottleneck cracked ?. *The American Journal of Human Genetics*. 62 : 752-757.
244. QIU C, ENQUOBAHRIE D A, GELAYE B et al. 2015. The association between leukocyte telomere length and mitochondrial DNA copy number in pregnant women: a pilot study. *Clinical Laboratory*. 61(3-4) : 363-9.
245. RAGHEB A et SABANEKH E. 2009. Smoking and male fertility: a contemporary review. *Archives of Medical Science*. 5(1A) : S13-9.
246. RAMAN R et NARAYAN G. 1995. 5-Aza deoxyCytidine-induced inhibition of differentiation of spermatogonia into spermatocytes in the mouse. *Molecular Reproduction and Development*. 42 : 284-90.
247. RANI D S, CARLUS S J, POONGOTHAI J et al. 2009. CAG repeat variation in the mtDNA polymerase gamma is not associated with oligoasthenozoospermia. *International Journal of Andrology*. 32 : 647-55.
248. RANTANEN A, JANSSON M, OLDFORS A et al. 2001. Downregulation of Tfam and mtDNA copy number during mammalian spermatogenesis. *Mammalian Genome*. 12(10) : 787-92.
249. RANTANEN A et LARSSON N G. 2000. Regulation of mitochondrial DNA copy number during spermatogenesis. *Human Reproduction*. 15(Suppl 2) : 86-91.
250. RAVEL C et CHANTOT-BASTARAUD S. 2006. Génétique des anomalies du tractus génital humain. *Médecine thérapeutique / Médecine de la reproduction*. 8 : 3.

251. RAVEL C, CHANTOT-BASTARAUD S, MCELREAVEY K *et al.* 2006. Molecular anomalies of the Y chromosome: Consequences on male fertility. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 34(10) : 885-93.
252. RAVEL C, EL HOUATE B, CHANTOT S *et al.* 2006. Haplotypes, mutations and male fertility : the story of the testis-specific ubiquitin protease *USP26*. *Molecular Human Reproduction*. 12 : 643-6.
253. RAVEL C, MANDELBAUM J, MCELREAVEY K *et al.* 2007. Polymorphismes génétiques et infertilité masculine. *Médecine thérapeutique / Médecine de la reproduction*. 9 (4) : 219-29.
254. RAVEL C *et* SIFFROI J P. 2009. Y chromosome structural abnormalities and Turner's syndrome. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 37(6) : 511-8.7
255. RAVEL C, CHANTOT-BASTARAUD S, CHALMEY C *et al.* 2009. Lack of association between genetic polymorphisms in enzymes associated with folate metabolism and unexplained reduced sperm counts. *PLoS One*. 4(8) : e6540.
256. REN J C, BANAN A, KESHAVARZIAN A *et al.* 2005. Exposure to ethanol induces oxidative damage in the pituitary gland. *Drug and Alcohol Review - Wiley Online Library*. 35 : 91-101.
257. RIEDL S J *et* SALVESEN G S. 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8 : 405-413.
258. RIORDAN J R, ROMMENS J M, KEREM B *et al.* 1989. Identification of the cystic fibrosis gene : cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 245(4922) : 1066-73.
259. RÖTIG A *et* MUNNICH A. 2003. Genetic Features of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders. *Journal of the American Society of Nephrology* . 14(12) : 2995-3007.
260. ROUZIER C, CHAUSSENOT A, SERRE V *et al.* 2014. Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments for the detection of large intragenic *POLG* rearrangements in a large French cohort. *European Journal of Human Genetics*. 22 : 542-50.
261. ROVIO A T, MARCHINGTON D R, DONAT S *et al.* 2001. Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (*POLG*) locus associated with male infertility. *Nature Genetics*. 29(3) : 261-2.
262. ROYSTON P. 1982. Algorithm AS 181 : The W Test for Normality. *Applied Statistics*. 31 : 176-180.
263. RUBES J, SELEVAN S G, EVENSON D P *et al.* 2005. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Human Reproduction*. 20 : 2776-2783.
264. RUIZ-PESINI E, LAPENA A C, DIEZ-SANCHEZ C *et al.* 2000. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *The American Journal of Human Genetics*. 67(3) : 682-96.
265. RUIZ-PESINI E, DIEZ-SANCHEZ C, LOPEZ-PEREZ M J *et al.* 2007. The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process ?. *Current Medicinal Chemistry*. 77 : 3-19.
266. RUSZ A, PILATZ A, WAGENLEHNER F *et al.* 2012. Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility. *World Journal of Urology*. 30 : 23-30.
267. RUWANPURA S M, MCLACHLAN R I, MEACHEM S J. 2010. Hormonal regulation of male germ cell development. *Journal of Endocrinology*. 205(2) : 117-31.

268. SAFARINEJAD M R, SHAFIEI N, SAFARINEJAD S. 2011. Relationship between genetic polymorphisms of *MTHFR* (C677T, A1298C, and G1793A) as risk factors for idiopathic male infertility. *Reproductive Sciences*. 18 : 304-315.
269. SALEHI Z, GHOLIZADEH L, VAZIRI H *et al.* 2012. Analysis of *GSTM1*, *GSTT1*, and *CYP1A1* in idiopathic male infertility. *Reproductive Sciences*. 19(1) : 81-85.
270. SAMUELS D C, SCHON E A, CHINNERY P F. 2004. Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends in Genetics*. 20(9) : 393-398.
271. SANETO R P *et* NAVIAUX R K. 2010. Polymerase gamma disease through the ages. *Developmental Disabilities Research Reviews*. 16 : 163-74.
272. SANGER F, NICKLEN S, COULSON A R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS-USA)*. 74(12) : 5463-5467.
273. SCHAPIRA A. 2012. Mitochondrial diseases. *The Lancet*. 379 (9828) : 1825-1834.
274. SCHEFFLER I. 2008. Mitochondria. *John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, États-Unis*. ISBN : 0-4712-2389-1.
275. SCHILL W B, MIEUSSET R, FRANK H *et al.* 2008. Traité d'andrologie à l'usage des cliniciens. *Springer-Verlag France*. p219. ISBN : 2-287-72080-4.
276. SERMONDADE N, FAURE C, DUPONT C *et al.* 2011. Nutrition et reproduction : la part du mâle. *Médecine thérapeutique / Médecine de la reproduction*. 13(4) : 240-5.
277. SETCHELL B P *et* MIEUSSET R. 1996. Testis thermoregulation : Male gametes production and quality. Edition INSERM, Paris. p65-73.
278. SETCHELL B P. 2008. Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 636 : 212-33.
279. SHAH P P, SAURABH K, PANT MC, MATHUR N *et al.* 2009. Evidence for increased cytochrome P450 1A1 expression in blood lymphocytes of lung cancer patients. *Mutation Research*. 670(1-2) : 74-78.
280. SHAHA C. 2007. Modulators of spermatogenic cell survival. *Society for Reproduction and Fertility*. 63 : 173-86.
281. SHAPIRO S S *et* WILK M B. 1965. An analysis of variance test for normality. *Biometrika*. 52(3) : 591-9.
282. SHARMA R *et* AGARWAL A. 2011. Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction. *Springer-Verlag, New York*. 512p. ISBN : 1-4419-6857-1.
283. SHEN O, LIU R, WU W *et al.* 2012. Association of the *MTHFR* Gene A1298C Polymorphism with Male Infertility: A Meta-Analysis. *Annals of Human Genetics*. 76 : 25-32.
284. SHIMIZU Y, NAKATSURU Y, ICHINOSE M *et al.* 2000. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS-USA)*. 97 : 779-782.
285. SHITARA H, KANEDA H, SATO A *et al.* 2000. Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. *Genetics*. 156(3) : 1277-84.
286. SIKKA S C. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medicinal Chemistry*. 8: 851-62.

287. SINGH K, SINGH S K, RAMAN R *et al.* 2010. *MTHFR* A1298C polymorphism and idiopathic male infertility. *Journal of Postgraduate Medicine*. 56 : 267-269.
288. SINGH K, SINGH S K, SAH R *et al.* 2005. Mutation C677T in the *MTHFR* gene is associated with male infertility in an Indian population. *International Journal of Andrology*. 28 : 115-119.
289. SKALETSKY H, KURODA-KAWAGUCHI T, MINX P J *et al.* 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 423 : 825-37.
290. SKJELBRED C F, SVENDSEN M, HAUGAN V *et al.* 2006. Influence of DNA repair gene polymorphisms of *hOGG1*, *XRCC1*, *XRCC3*, *ERCC2* and the folate metabolism gene *MTHFR* on chromosomal aberration frequencies. *Mutation Research*. 602 : 151-162.
291. SLIWERSKA E *et* SZPECHT-POTOCKA A. 2002. Mutations of *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* genes as high risk factors for neural tube defects. *Med Wieku Rozwoj (Developmental Period Medicine)*. 6(4) : 371-82.
292. SOHN K J, JANG H, CAMPAN M, WEISENBERGER D *et al.* 2009. The *MTHFR* C677T mutation induces cell-specific changes in genomic DNA methylation and uracil misincorporation: A possible molecular basis for the site-specific cancer risk modification. *International Journal of Cancer*. 124(9) : 1999-2005.
293. SOKOL R Z, KRAFT P, FOWLER I M *et al.* 2006. Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environmental Health Perspectives*. 114 : 360-365.
294. SOONG N W, HINTON D R, CORTOPASSI G *et al.* 1992. Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain. *Nature Genetics*. 2(4) : 318-323.
295. SPIROPOULOS J, TURNBULL D M, CHINNERY P F. 2002. Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction?. *Molecular Human Reproduction*. 8(8) : 719-21.
296. SPURR N K, GOUGH A C, STEVENSON K *et al.* 1987. *Msp*-1 polymorphism detected with a cDNA probe for the P-450 I family on chromosome 15. *Nucleic Acids Research*. 15 : 5901.
297. ST JOHN J C, COOKE ID, BARRATT C L. 1997. Mitochondrial mutations and male infertility. *Nature Medicine*. 3(2) : 124-5.
298. ST JOHN J C, JOKHI R P, BARRATT C L. 2001. Men with oligo-astheno-teratozoospermia harbour higher numbers of multiple mitochondrial DNA deletions in their spermatozoa, but individual deletions are not indicative of overall aetiology. *Molecular Human Reproduction*. 7(1) : 103-11.
299. STANGLER HERODEZ S, ZAGRADISNIK B *et al.* 2013. *MTHFR* C677T and A1298C genotypes and haplotypes in Slovenian couples with unexplained infertility problems and in embryonic tissues from spontaneous abortions. *Balkan Journal of Medical Genetics*. 16(1) : 31-40.
300. STEFFANN J. 2006. Étude de la ségrégation de l'ADN mitochondrial au cours du développement embryono-foetal humain. *Thèse en ligne : Université Paris 5 René Descartes*. Pagination multiple.
301. STUMPF J D, SANETO R P, COPELAND W C. 2013. Clinical and molecular features of *POLG* related mitochondrial disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 5 : a011395.
302. SUTOVSKY P, MORENO R D, RAMALHO-SANTOS J *et al.* 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*. 402 : 371-2.
303. SZUHAI K, OUWELAND J, DIRKS R *et al.* 2001. Simultaneous A8344G heteroplasmy and mitochondrial DNA copy number quantification in myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome by a multiplex molecular beacon based real-time fluorescence PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(3) : E13.

304. **TAHMASBPOUR E, BALASUBRAMANIAN D, AGARWAL A.** 2014. A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 31 : 1115-1137.
305. **TANAKA M, GONG J S, ZHANG J et al.** 1998. Mitochondrial genotype associated with longevity. *The Lancet*. 351(9097) : 185-6.
306. **TAYLOR R W et TURNBULL D M.** 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*. 6(5) : 389-402.
307. **THANGARAJ K, JOSHI M B, REDDY A A.** 2003. Sperm mitochondrial mutations as a cause of low sperm motility. *Journal of Andrology*. 24. 388-392.
308. **THAYER R E, WITTOCK R, PARR R et al.** 2003. A maternal line study investigating the 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *Exp Gerontol. Experimental Gerontology*. 38(5) : 567 - 71.
309. **THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM.** 2005. A Haplotype Map of the Human Genome. *Nature*. 437 : 1299-1320.
310. **THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM.** 2007. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 449 : 851-861.
311. **THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM.** 2010. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*. 467 : 52-58.
312. **THEVÈS C.** 2006. Recherche de mutations ponctuelles de l'ADN mitochondrial dans l'os pour une détermination de l'âge. *Thèse en ligne : École des hautes études en sciences sociales (EHESS)*. Pagination multiple.
313. **THOMPSON W E, RAMALHO-SANTOS J et al.** 2003. Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biology of Reproduction*. 69 : 254-26.
314. **THORBURN D R et DAHL H H.** 2001. Mitochondrial disorders: genetics, counseling, prenatal diagnosis and reproductive options. *American Journal of Medical Genetics*. 106 : 102-114.
315. **THORBURN D R, SUGIANA C, SALEMI R et al.** 2004. Biochemical and molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1659 : 121-8.
316. **TIEPOLO L et ZUFFARDI O.** 1976. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Human Molecular Genetics*. 34(2) : 119-24.
317. **TRAN P, LECLERC D, CHAN M et al.** 2002. Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mammalian Genome*. 13 : 483-92.
318. **TSAO C Y, MENDELL J R, BARTHOLOMEW D.** 2001. High mitochondrial DNA T8993G mutation (<90%) without typical features of Leigh's and NARP syndromes. *Journal of Child Neurology*. 16 : 533-535.
319. **TURRENS J F.** 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 552 : 335-344.
320. **TZOULIS C, ENGELSEN B A, TELSTAD W et al.** 2006. The spectrum of clinical disease caused by the A467T and W748S *POLG* mutations : a study of 26 cases. *Brain*. 129 : 1685-92.

321. VAKHARIA D D, LIU N, PAUSE R *et al.* 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures: effect on PAH induction of *CYP1A1* in human HEPG2 cells. *Drug Metabolism and Disposition*. 29(7) : 999-1006.
322. VAN DER PUT N M J, GABREELS F, STEVENS E M *et al.* 1998. A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects ? *The American Journal of Human Genetics*. 62 : 1044-1051.
323. VAN DER WALT J M, NICODEMUS K K, MARTIN E R *et al.* 2003. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *The American Journal of Human Genetics*. 72(4) : 804-11.
324. VAN GOETHEM G, DERMAUT B, LOFGREN A *et al.* 2001. Mutation of *POLG* is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature Genetics*. 28 : 211-2.
325. VAN GOETHEM G, MARTIN J J, VAN BROECKHOVEN C. 2003. Progressive external ophthalmoplegia characterized by multiple deletions of mitochondrial DNA : unraveling the pathogenesis of human mitochondrial DNA instability and the initiation of a genetic classification. *NeuroMolecular Medicine*. 3 : 129-146.
326. VANI G T, MUKESH N, SIVA-PRASAD B *et al.* 2009. Association of *CYP1A1*2A* polymorphism with male infertility in Indian population. *Clinica Chimica Acta*. 410(1-2) : 43-47.
327. WAI T, TEOLI D, SHOUBRIDGE E A. 2008. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nature Genetics*. 40 : 1484-8.
328. WALLACE D C. 1993. Mitochondrial diseases: genotype *versus* phenotype. *Trends in Genetics*. 9 : 128-133.
329. WALLACE D C, BROWN M D, LOTT M T. 1999. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*. 238(1) : 211-30.
330. WALLACE D C. 2007. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annual Review of Biochemistry*. 76 : 781-821.
331. WALLERAND H, BERNARDINI S, CHABANNES E *et al.* 2003. Genetic cause of male infertility and molecular biology. *Progrès en urologie*. 13(4) : 560-3.
332. WALLOCK L M, TAMURA T, MAYR C A *et al.* 2001. Low seminal plasma folate concentrations are associated with low sperm density and count in male smokers and nonsmokers. *Fertility and Sterility*. 75 : 252-9.
333. WANG C *et* YOULE R J. 2009. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annual Review of Genetics*. 43 : 95-118.
334. WEI B, XU Z, RUAN J *et al.* 2012. *MTHFR* 677C>T and 1298A>C polymorphisms and male infertility risk: a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*. 39 : 1997-2002.
335. WELCH B L. 1951. On the comparison of several mean values: An alternative approach. *Biometrika*. 38 : 330-336.
336. WESTERVELD G H, KAAIJ-VISSER L, TANCK M *et al.* 2008. CAG repeat length variation in the polymerase gamma (*POLG*) gene : effect on semen quality. *Molecular Human Reproduction*. 14 : 245.
337. WHEATER Y H. 2004. Histologie fonctionnelle. 4^{ème} Édition. *Edition De Boeck Université, Bruxelles*. ISBN : 2744501263.

338. WILLIAMS J A, MARTIN F L, MUIR G H *et al.* 2000. Metabolic activation of carcinogens and expression of various cytochromes P450 in human prostate tissue. *Carcinogenesis*. 21(9) : 1683-9.
339. WITTENHAGEN L M *et al.* 2003. Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function. *Trends in Biochemical Sciences*. 28(11) : 605-11.
340. WONG L J, NAVIAUX R K, BRUNETTI-PIERRI N *et al.* 2008. Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to *POLG* mutations. *Human Mutation*. 29 : E150-72.
341. WONG W Y, MERKUS H M, THOMAS C M *et al.* 2002. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertility and Sterility*. 77 : 491-8.
342. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1999. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4^{ième} édition. *Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni*. 138p. ISBN: 0-5216-4599-9.
343. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2010. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5^{ième} édition. *Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni*. 140p. ISBN: 9-2415-4778-2.
344. YAHIA M. 2007. Diagnostic, physiopathologie et génétique de la mucoviscidose dans la population de l'est et sud algérien ; gène CFTR et l'absence bilatérale des canaux déférents. *Thèse en ligne : Université Mentouri Constantine*. p26-27.
345. YAO N, ZHENG J F, PENG Y F *et al.* 2006. CAG repeats of DNA polymerase gamma in Chinese males and relationship of idiopathic male infertility to CAG repeats. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 12 : 681-4, 688.
346. YAROSH S L, KOKHTENKO E V, STARODUBOVA N I *et al.* 2013. Smoking Status Modifies the Relation Between CYP1A1*2C Gene Polymorphism and Idiopathic Male Infertility: The Importance of Gene- Environment Interaction Analysis for Genetic Studies of the Disease. *Reproductive Sciences*. 20(11) : 1302-1307.
347. ZENTENO J C, LOPEZ M, VERA C *et al.* 1997. Two *SRY*-negative XX male brothers without genital ambiguity. *Human Molecular Genetics*. 100(5-6) : 606-10.
348. ZEVIANI M *et al.* 2007. Mitochondrial disorders. *Current Opinion in Neurology*. 20(5) : 564-71.
349. ZHANG B, SAYER S, HAMMANS S R *et al.* 2003. A study of mitochondrial DNA mutations in peripheral lymphocytes in a aging cohort. *Biochemical Society Transactions*. 31(2) : 444-446.
350. ZHANG J, JIANG W, ZHOU Q *et al.* 2016. CAG-repeat polymorphisms in the polymerase γ gene and male infertility : a meta-analysis. *Andrologia*. doi : 10.1111/and.12526.
351. ZHANG L, CHAN S S, WOLFF D J. 2011. Mitochondrial disorders of DNA polymerase gamma dysfunction: from anatomic to molecular pathology diagnosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 135 : 925-34.
352. ZHU X, LIU Z, ZHANG M *et al.* 2016. Association of the *MTHFR* gene C677T polymorphism with the risk of male infertility: a meta-analysis. *Renal Failure*. 38(2) : 185-93.
353. ZIELENSKI J, ROZMAHEL R, BOZON D *et al.* 1991. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regular (*CFTR*) gene. *Genomic*. 10 : 214-228.
354. ZULLO S J, BUTLER L, ZAHORCHAK R J *et al.* 1997. Localization by FISH of human *POLG* to human chromosome band 15q24-->q26, and of mouse mitochondrial polymerase gamma (Polg) to mouse chromosome band 7E, with confirmation by direct sequence analysis of BACs. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 78 : 281-4.

Annexes

I- Gènes nucléaires impliqués dans des cytopathies mitochondriales

(Adapté de <http://mitomap.org/>) (Mise à jour Mars 2014) (Consultée le 27-12-2015).

Tableau I : Mutations de gènes codants pour des protéines structurales de la mitochondrie.

Complexe de la CRM	Gène	Localisation chromosomique	Hérédité	Phénotype clinique
Complexe I	<i>NDUFS1</i>	2q33-q34	AR	Syndrome de Leigh
	<i>NDUFS2</i>	1q23	AR	Encéphalopathie, cardiomyopathie
	<i>NDUFS3</i>	11p11.11	AR	Syndrome de Leigh
	<i>NDUFS4</i>	5q11.1	AR	Syndrome de Leigh
	<i>NDUFS6</i>	5pter-p15.33	AR	Acidose lactique infantile fatale
	<i>NDUFS7</i>	19p13.3	AR	Syndrome de Leigh
	<i>NDUFS8</i>	11q13	AR	Syndrome de Leigh
	<i>NDUFB3</i>	2q31.3	AR	Acidose lactique infantile fatale
	<i>NDUFV1</i>	11q13	AR	Syndrome de Leigh
	<i>NDUFV2</i>	18p11	AR	Cardiomyopathie, hypotonie, encéphalopathie
	<i>NDUFA1</i>	Xq24	X	Syndrome de Leigh, désordres neuro-dégénératives progressives
	<i>NDUFA2</i>	5q31.2	AR	Syndrome de Leigh
	<i>NDUFA10</i>	2q37.3	AR	Syndrome de Leigh
	<i>NDUFA11</i>	19p13.3	AR	Acidose lactique infantile fatale, Encéphalo-cardiomyopathie
Complexe II	<i>SDH-A</i>	5p15	AR	Syndrome de Leigh
	<i>SDH-B</i>	1p36.1-p35	AD	Phéochromocytome et paragangliome
	<i>SDH-C</i>	1q21	AD	Paragangliome autosomique dominant de type 3
	<i>SDH-D</i>	11q23	AD	Paragangliome autosomique dominant de type 1, phéochromocytome
Complexe III	<i>UQCRB</i>	8q22	AR	Hypoglycémie et acidose lactique
	<i>UQCRQ</i>	5q31.1	AR	Phénotype neurologique sévère
Complexe IV	<i>COX6B1</i>	19q13.1	AR	Encéphalomyopathie
Complexe V	<i>ATP5E</i>	20q13.3	AR	Acidose lactique, retard mental, neuropathie périphérique

AD : Autosomique Dominant

AR : Autosomique Récessif

X-Linked : Liée à l'X

GRACILE : Growth Retardation, Aminoaciduria, Cholestasis, Iron overload, Lactic acidosis, and Early death

MDDS : Mitochondrial DNA Depletion Syndrome

MNGIE : Mitochondrial Neuro-Gastro-Intestinal Encephalopathy

PEO : Progressive External Ophthalmoplegia

SANDO : Sensory Ataxic Neuropathy, Dysarthria, and Ophthalmoparesis

SCAE : Spinocerebellar Ataxia with Epilepsy

Tableau II : Mutations de gènes codants pour des protéines impliquées dans l'assemblage des complexes de la CRM.

Gène	Fonction	Localisation chromosomique	Hérédité	Phénotype clinique
<i>NDUFAF1</i>	Assemblage du complexe I	15q13.3	AR	Cardio-Encéphalo-Myopathie
<i>NDUFAF2</i>		5q12.1	AR	EOPE
<i>NDUFAF3</i>		3p21.31	AR	Encéphalopathie néonatale
<i>NDUFAF4</i>		6q16.1	AR	Encéphalopathie infantile
<i>C20orf7</i>		20p12.1	AR	Syndrome de Leigh
<i>NUBPL</i>		14q12	AR	Encéphalomyopathie
<i>FOXRED1</i>	Inconnue (Assemblage du complexe I)	11q24.2	AR	Syndrome de Leigh
<i>ACAD9</i>	Assemblage et activité du complexe I	3q26	AR	Cardiopathie hypertrophique (encéphalopathie)
<i>SDHAF1</i>	Assemblage du complexe II	19q12-q13.2	AR	Leuco-encéphalopathie
<i>SDHAF2</i>		11q12.2	AD	Paragangliome autosomique dominant de type 2
<i>BCS1L</i>	Assemblage du complexe III	2q33	AR	Encéphalopathie, déficience hépatique et tubulopathie, syndrome de Leigh, syndrome GRACILE, syndrome Bjornstad
<i>SURF1</i>	Assemblage du complexe IV	9q34	AR	Syndrome de Leigh
<i>SCO1</i>	Transport du cuivre pour le complexe IV	17p13-p12	AR	Déficience hépatique néonatal et encéphalopathie
<i>SCO2</i>		22q13	AR	Cardio-Encéphalo-Myopathie congénital
<i>COX10</i>	Heme A farnesyl-transferase complexe IV	17p12-p11.2	AR	Tubulopathie néonatale et encéphalopathie, Syndrome de Leigh et cardiomyopathie
<i>COX15</i>	Heme A synthèse complexe IV	10q24	AR	Cardiomyopathie hypertrophique précoce, syndrome de Leigh
<i>LRPPRC</i>	Assemblage du complexe IV	2p21-p16	AR	Syndrome de Leigh
<i>FASTKD2</i>	Rôle dans l'apoptose complexe IV	2q33.3	AR	Encéphalomyopathie
<i>TACO1</i>	Activateur traductionnel de la COX1	17q22-q24.2	AR	Syndrome de Leigh
<i>ATPAF2</i>	Assemblage du complexe V	17p11.2	AR	Encéphalopathie précoce, acidose lactique
<i>TMEM70</i>		8q21.11	AR	Encéphalopathie néonatal, cardiomyopathie

Tableau III : Mutations de gènes codants pour des protéines impliquées dans la stabilité de l'ADNmt.

Gène	Fonction	Localisation chromosomique	Hérédité	Phénotype clinique
<i>POLG1</i>	Réplication de l'ADNmt	15q25	AD AR	Syndrome d'Alpers, PEO-AD et AR, infertilité masculine, syndrome SANDO*, SCAE*
<i>POLG2</i>	Sous-unité catalytique de de l'ADN polymérase gamma	17q23-q24	AD	PEO-AD
<i>ANT1</i>	Isoforme 1 du transporteur de l'adénine nucléotide	4q35	AD	PEO-AD, délétions multiples de l'ADNmt
<i>MPV17</i>	Régulation du nombre de copies de de l'ADNmt	2p23-p21	AR	MDDS hépato-cérébral
<i>C10ORF2</i>	L'hélicase Twinkle	10q24	AD	PEO-AD, syndrome SANDO
<i>TYMP</i>	Thymidine phosphorylase	22q13.32-qter	AR	MNGIE, déplétion de l'ADNmt
<i>DGUOK</i>	Déoxy-guanosine kinase 1 (maintenance du pool de dNTPmt)	2p13	AR	Déplétion hépato-cérébral de l'ADNmt
<i>RRM2B</i>	Ribo-nucléotide réductase M2B (maintenance du pool de dNTPmt)	8q23.1	AR	Encéphalomyopathie, tubulopathie rénal, MNGIE, PEO-AD
<i>SUCLA2</i>	Sous-unité beta de la succinate-CoA ligase	13q12.2-q13	AR	Encéphalomyopathie avec acidurie méthyle-malonique
<i>SUCLG1</i>	Sous-unité alpha de la succinate-CoA ligase	2p11.2	AR	Encéphalomyopathie avec acidurie méthyle-malonique
<i>TK2</i>	Thymidine kinase (maintenance du pool de dNTPmt)	16q22	AR	Déplétion myopathique de l'ADNmt

Tableau IV : Mutations de gènes impliqués dans l'import de protéines mitochondriales.

Gène	Fonction	Localisation chromosomique	Hérédité	Phénotype clinique
<i>DDP</i>	Importation des protéines Mitochondriales	Xq22	X-linked	Syndrome de Mohr-Tranebjaerg (Surdité-dystonie)
<i>DNAJC19</i>		3q26.3	AR	Cardiomyopathie, ataxie

Tableau V : Mutations de gènes impliqués dans la synthèse de protéines mitochondriales.

Gène	Fonction	Localisation chromosomique	Hérédité	Phénotype clinique
<i>EFG1</i>	Facteur d'élongation G1 Traduction mitochondrial	3q25	AR	Hépto-encéphalopathie et Acidose lactique sévère
<i>YARS2</i>	Tyrosyl-tRNA synthétase	12p11.21	AR	Myopathie, acidose lactique et anémie sidéroblastique
<i>SARS2</i>	Seryl-tRNA synthétase	19q13.2	AR	Hyper-uricémie, hypertension pulmonaire, défaillance rénal
<i>DARS2</i>	Aspartyl-tRNA synthétase	1q25.1	AR	Leuco-encéphalopathie et acidose lactique
<i>RARS2</i>	ARginylyl-tRNA synthétase	6q16.1	AR	Hypoplasie ponto-cérébelleuse
<i>MRPS16</i>	Traduction mitochondrial	10q22.1	AR	Acidose lactique néonatal et Agénésie du corps calleux
<i>MRPS22</i>	Traduction mitochondrial	3q23	AR	Cardiomyopathie, tubulopathie
<i>TSMF</i>	Traduction mitochondrial (Élongation)	12q13-q14	AR	Encéphalomyopathie, cardiomyopathie hypertrophique
<i>TUFM</i>	Traduction mitochondrial (Élongation)	16p11.2	AR	Leucodystrophie avec micro-polygyrie

Tableau VI : Mutations de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer mitochondrial.

Gène	Fonction	Localisation chromosomique	Hérédité	Phénotype clinique
<i>FRDA</i>	Frataxine	9q13	AR	Ataxie de Friedrich, neuropathie, cardiomyopathie, diabète
<i>ABCB7</i>	Transport du Fer	Xq13.1-q13.3	X-linked	Anémie sidéroblastique avec ataxie liée à l'X
<i>GLRX5</i>	Biosynthèse des centres Fer-Souffre	3p22.1	AR	Anémie sidéroblastique
<i>ISCU</i>		12q23.3	AR	Myopathie, acidose lactique, intolérance à l'exercice
<i>BOLA3</i>		2p13.1	AR	Encéphalomyopathie, cardiomyopathie
<i>NFU1</i>		2p13.3	AR	Acidose lactique et multiples déficiences de la chaîne respiratoire

Tableau VII : Mutations de gènes impliqués dans la biogenèse du coenzyme Q.

Gène	Fonction	Localisation chromosomique	Hérédité	Phénotype clinique
<i>COQ2</i>	Biogenèse du coenzyme Q	4q21-q22	AR	Encéphalomyopathie, néphropathie
<i>COQ4</i>		9q34.13	AR	Encéphalomyopathie, retard mental
<i>COQ9</i>		16q13	AR	Acidose lactique néonatal, convulsions, cardiomyopathie
<i>APTX</i>		9p13.3	AR	Ataxie cérébelleuse, apraxie oculomotrice
<i>PDSS1</i>		10p12.1	AR	Surdité, valvulopathie, retard mental
<i>PDSS2</i>		6q21	AR	Syndrome de Leigh, syndrome néphrotique
<i>CABC1</i>		1q42.2	AR	Ataxie cérébelleuse, acidose lactique

Tableau VIII : Mutations de gènes codants pour des protéines chaperonnes de la mitochondrie.

Gène	Fonction	Localisation chromosomique	Hérédité	Phénotype clinique
<i>SPG7</i>	Paraplegin ATPase protease	16q24.3	AR	Paraplégie spastique
<i>HSPD1</i>	Chaperonne mitochondrial	2q33.1	AR	Paraplégie spastique, leucodystrophie

Tableau IX : Mutations de gènes impliqués dans l'intégrité mitochondriale.

Gène	Fonction	Localisation Chromosomique	Hérédité	Phénotype clinique
<i>OPA1</i>	Dynamin-related protein	3q28-q29	AD	AD-Atrophie optique Délétions multiples
<i>MFN2</i>	Mitofusine Fusion mitochondrial	1p36-p35	AD	Maladie de Charcot Marie-Tooth -2A
<i>DLPI</i>	Fission mitochondrial et peroxysomale	12p11.21	AD	Microcéphalie, développement anormal du cerveau, atrophie optique, acidose lactique
<i>G4.5</i> (<i>Tafazzin</i>)	Défaut de synthèse de la Cardiolipine	Xq28	X-linked	Syndrome de Barth, cardiomyopathie dilatée liée à l'X
<i>RMRP</i>	RNAse Mitochondrial RNA Processing	9p13-p12	AR	Chondrodysplasie métaphysaire

Tableau X : Mutations de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial.

Gène	Fonction	Localisation chromosomique	Hérédité	Phénotype clinique
<i>PDHA1</i>	Pyruvate déshydrogénase E1- α subunit	Xp22.2-p22.1	X-linked	Syndrome de Leigh
<i>ETHE1</i>	Métabolisme de l'acide éthylmalonique	19q13	AR	Encéphalopathie, Acidurie éthylmalonique
<i>PUS1</i>	Pseudo-Uridine Synthase	12q24.33	AR	Myopathie, acidose lactique et anémie sidérolastique

II- Liste des haplogroupes de l'ADNmt définis par RFLP à haute résolution

(Cann *et al.*, 1987).

Continent	Haplogroupe	Variants de l'ADNmt
Afrique	L1	3592 + <i>Hpa</i> I, 10806 + <i>Hinf</i> I
	L2	3592 + <i>Hpa</i> I, 16389 + <i>Hin</i> I/16390 – <i>Ava</i> II
Europe	H	7025 - <i>Alu</i> I 39
	T	T 13366 + <i>Bam</i> HI, 15606 + <i>Alu</i> I
	U	12308 + <i>Hinf</i> I
	V	4577 – <i>Nla</i> III
	W	8249 + <i>Ava</i> II/8250 - <i>Hae</i> III ; 8944 + <i>Rsa</i> I
	X	1715 – <i>Dde</i> I
	I	10032 + <i>Alu</i> I; 4529 - <i>Hae</i> II ; 8249 + <i>Ava</i> II ; 16389 + <i>Bam</i> HI/ <i>Mbo</i> I
	J	13704 - <i>Bst</i> NI ; 16065 – <i>Hinf</i> I
	K	9052 - <i>Hae</i> II/ <i>Hha</i> I
Asie	A	663 + <i>Hae</i> III
	B	8271-8281 délétion de 9 pb ; 16517 + <i>Hae</i> III
	F	12406 - <i>Hpa</i> I/ <i>Hinc</i> II ; 16517 + <i>Hae</i> III
	M	10394 + <i>Dde</i> I ; 10397 + <i>Alu</i> I
	M-C	13259 -/13262 + <i>Hinc</i> II/ <i>Alu</i> I
	M-D	5176 – <i>Alu</i> I
Amérique	A	663 + <i>Hae</i> III
	A	663 + <i>Hae</i> III ; 16329 – <i>Rsa</i> I
	B	8271-8281 délétion de 9 pb ; 16517 + <i>Hae</i> III
	M-C	13259-/13262 + <i>Hinc</i> II/ <i>Alu</i> I
	M-D	5176 – <i>Alu</i> I

III- Définition des paramètres spermatiques normaux et anomalies associées (OMS, 2010).

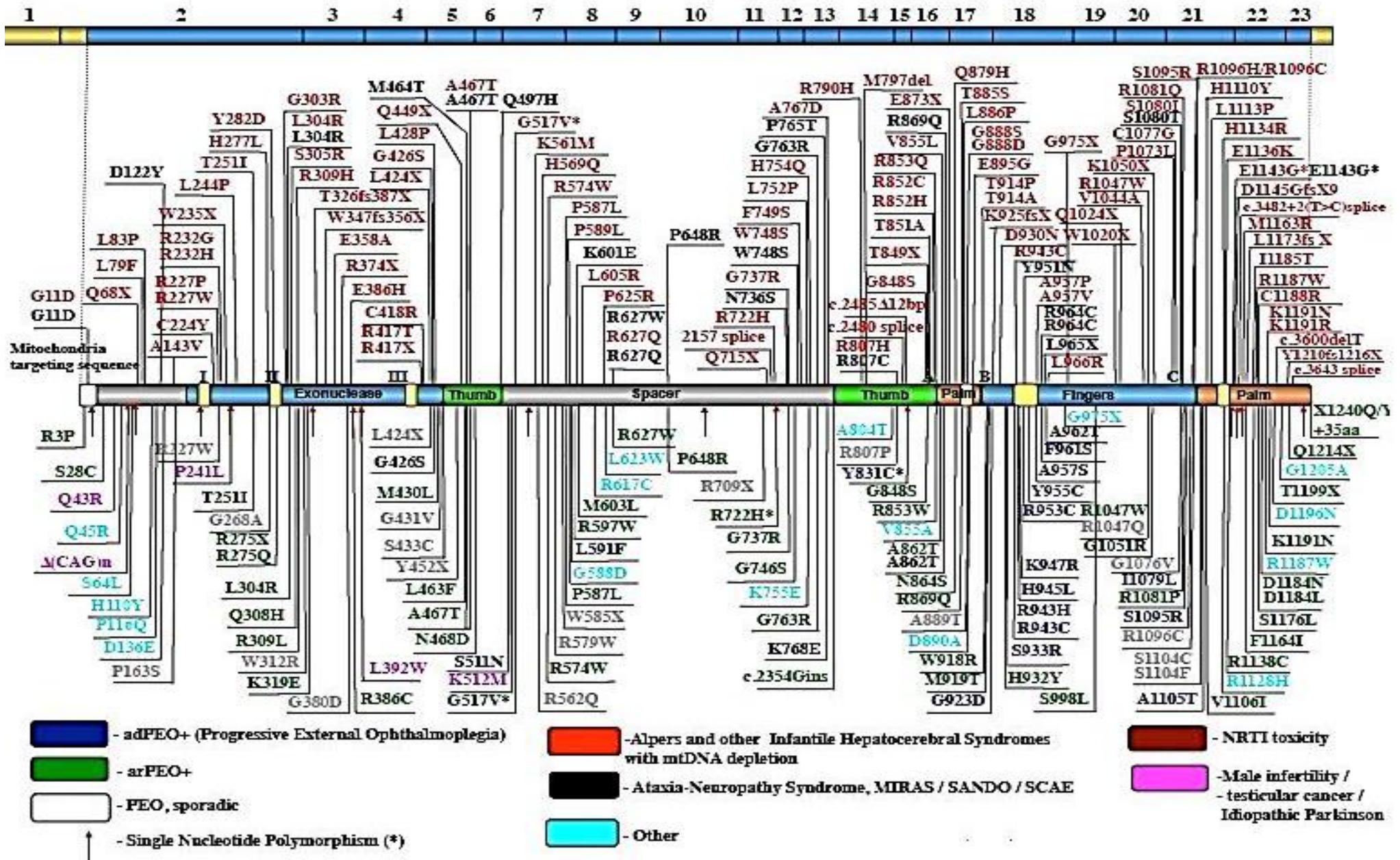
Valeurs normales	Définitions de l'anomalie	
Volume du sperme : > 1,5 ml (1,4 à 1,7)	< 1,5 ml : hypospermie	
	> 6 ml : hyperspermie	
Numération des spermatozoïdes (par ml) : > 15 millions/ml (12 à 16)	< 15 millions/ml : oligozoospermie 0 : azoospermie	
Numération des spermatozoïdes (par éjaculat) : > 39 millions (33 à 46)	< 39 millions/éjaculat 0 : azoospermie	
Mobilité des spermatozoïdes à la première heure après l'éjaculation. - Grade (a) : mobilité en trajet fléchant, rapide (>25 µm/s), - Grade (b) : mobilité lente et progressive (5-25 µm/s), - Grade (c) : mobilité sur place, - Grade (d) : immobile.	Mobilité progressive de type (a + b) des spermatozoïdes : < 32 % (31 à 34) (ou < 30 %)	Asthénospermie
	Mobilité de type (a + b + c) des spermatozoïdes : < 40 % (38 à 42)	
Mobilité à la quatrième heure après l'éjaculation.	Chute de mobilité inférieure à 50 % comparativement aux chiffres de la première heure	
Morphologie normale des spermatozoïdes : > 30 % > 4 % (3,0 à 4,0) (se rapproche de la classification Kruger) Ou : > 15 % (selon la classification de David modifiée par Auger et Eustache).	< 4 % : tératozoospermie	
Leucocytes < 1 million/ml > Leucospermie		
Vitalité des spermatozoïdes : > 58 % (55 à 63)	< 58 % : nécrozoospermie	
Autres valeurs normales (consensus)		
<ul style="list-style-type: none"> - pH : > 7,2 - MAR test (anticorps anti-spermatozoïdes de type IgA, IgG, IgM fixés sur les spermatozoïdes) : < 50 %, - Immunobead test (ou spermatozoïdes mobiles avec anticorps anti-spermatozoïdes) : < 50 %, - Peroxydase-positives leucocytes : < (1,0) (million/ml), - Fructose séminale : > (13) µmol/éjaculat, - Phosphatase acide séminale : > 200 U/éjaculat, - Acide citrique séminale : > 52 µmol/éjaculat, - Zinc séminale : > (2,4) µmol/éjaculat, - Seminal neutral glucosidase : > (20) mU/éjaculat, - L-carnitine séminale : 0,8 à 2,9 µmol/éjaculat. 		

Immédiatement après éjaculation, le sperme est déposé dans une étuve à 37° C pour assurer sa liquéfaction (environ 30 min). Au terme de celle-ci, l'examen est réalisé. Un aspect anormal, tel qu'une hémospemie, ou une forte viscosité doit être noté.

- **pH** : le pH du sperme est normalement compris entre 7,4 et 8,0. Des valeurs trop faibles peuvent être le reflet d'un défaut de sécrétion des vésicules séminales (normalement alcalines) alors qu'un pH nettement alcalin peut révéler une insuffisance des sécrétions prostatiques (normalement légèrement acides).
- **Volume** : il traduit essentiellement les capacités sécrétoires des glandes annexes. Une hyperspermie (volume > 6 ml) est généralement le témoin d'une hypersécrétion des vésicules séminales qui normalement forment l'essentiel du volume de l'éjaculat et ne doit pas être considérée comme pathologique. Par contre, lorsqu'il n'existe pas de problème lié au recueil (perte d'une fraction de l'éjaculat), l'hypospermie (volume < 2 ml) peut s'expliquer soit par un trouble de l'éjaculation, soit par une insuffisance sécrétoire de l'une des glandes annexes pouvant être liée à une infection (prostatite, vésiculite) ou à l'absence même de vésicules séminales.
- **Nombre de spermatozoïdes** : il est exprimé en concentration (millions/ml). Si aucun spermatozoïde n'est observé par la technique classique, il est nécessaire de rechercher les spermatozoïdes dans le culot de centrifugation du sperme, avant de conclure ou non à une azoospermie.
- **Mobilité** : la mobilité appréciée au microscope optique est exprimée en pourcentage de spermatozoïdes mobiles. Une évaluation qualitative est réalisée de façon subjective en différenciant les spermatozoïdes se déplaçant suivant une trajectoire sensiblement linéaire de ceux mobiles sur place ou ne progressant que très faiblement. L'examen est réalisé dans l'heure qui suit la liquéfaction avec un suivi de 4 heures. Des systèmes d'analyse vidéo-micrographique assistée par ordinateur (système CASA : Computer Assisted Semen Analysis) permettent une mesure automatique objective. Ces appareils ont connu un essor important ces dernières années. Leur principe est basé sur l'étude des trajectoires de la tête du gamète qui sont un bon reflet de l'activité flagellaire.
- **Vitalité** : elle reflète le pourcentage de spermatozoïdes vivants, elle trouve son intérêt dans les cas où la mobilité est faible.
- **Cellules rondes** : les cellules épithéliales de l'urètre, les cellules germinales immatures et les leucocytes sont regroupés sous ce terme de "cellules rondes". Dans les cas où ce nombre est élevé, les polynucléaires, témoins d'un foyer infectieux doivent être précisément recherchés en utilisant des colorations spécifiques basées le plus souvent sur la révélation histochimique de la peroxydase (**OMS, 2010**).

IV- Mutations et polymorphismes répertoriés sur le gène de la *POLG1*

(<http://tools.niehs.nih.gov/polg/>) (mise à jours Juin 2015, consulté le 22-12-2015).



V- Consentement pour utilisation de données biologiques.

M REZGOUNE M^{ed} LARBI

Maitre-assistant classe A

Département de Biologie Animale - Faculté SNV

Université des frères Mentouri - Constantine I

Tel : 031 81 82 49 / Courriel : rezgoune.genetique25@gmail.com

Je soussigné : né le/...../..... à

Certifie avoir reçu de **M REZGOUNE M^{ed} LARBI** une information exhaustive et compréhensible concernant les causes possibles de mon problème de fertilité. J'ai eu la possibilité de poser toutes les questions que je souhaitais.

J'ai compris qu'une analyse génétique m'est proposée à partir d'un prélèvement sanguin duquel mon ADN sera extrait. Cette analyse a pour but de déterminer si mon génome présente une anomalie ou une variation en rapport avec mon problème de santé. J'ai bien compris les implications possibles de cette étude et je pourrai obtenir, si je le souhaitais, toute information complémentaire. Il m'a été précisé qu'une partie de cette analyse génétique se fera à l'étranger.

Les résultats de ces analyses me seront transmis si je le désire. Ils resteront confidentiels et ne pourront être communiqués qu'avec mon autorisation exclusive.

Je peux à tout moment décider de ne pas poursuivre cette démarche. Les données génétiques et le matériel biologique me concernant pourront être détruits à ma demande.

J'accepte que mes échantillons biologiques soient conservés et utilisés à des fins de recherche médicale et/ou biologique sans restriction sous couvert d'anonymat.

Fait à le/...../.....

Signature de l'intéressé

Signature du chercheur

Consentement établi selon la déclaration d'Helsinki : Principes éthiques applicables aux recherches médicales sur des sujets humains. 1964.

En accord avec les recommandations du conseil national de l'éthique des sciences de la santé Algérien.

En accord avec les recommandations décrites dans l'article R1131-4 du code de santé publique Français.

VI- Protocole d'extraction de l'ADN utilisé (au NaCl)

(Miller *et al.*, 1988).

Après réalisation d'un prélèvement sanguin de 5 à 10 ml dans des tubes EDTA, l'extraction de l'ADN est lancée immédiatement ou (si les conditions ne le permettent pas) dans les 3 jours qui suivent la réalisation du prélèvement conservé à +4°C. L'extraction de l'ADN se fait en 3 étapes :

- **Préparation des leucocytes** : les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique des érythrocytes dans un tampon Tris-EDTA (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5) (TE) 20:5 pendant 10 minutes dans la glace. Après lavage, le culot est remis en suspension dans le TE 20:5.

- **Extraction de l'ADN** : se fait par ajout d'un tampon de lyse (NaCl 400 mM, EDTA 2 mM, Tris 10 mM, pH 8,2), du Sodium Dodécyle Sulfate (SDS) à 10 % et de la protéinase K à 10 mg/ml.

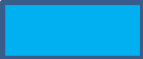

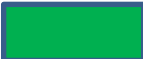



Les tubes sont mis en rotation sur une roue, à 27°C, pendant une nuit, et sont refroidis le lendemain dans la glace pendant 5 minutes. On ajoute ensuite 1 ml de NaCl 4M pour permettre la libération de l'ADN nucléaire dans le lysat ainsi que la digestion et l'élimination des protéines qui lui sont associées par précipitation avec ce solvant inorganique. La pelote d'ADN est formée dans le surnagent par précipitation avec l'éthanol pur. Une fois la pelote d'ADN récupérée avec une pipette Pasteur, elle est rincée deux fois dans l'éthanol à 70 % et mise ensuite dans un tube Nunc[®] de 1,5 ml.

- **Solubilisation** : l'ADN ainsi obtenu est solubilisé en phase aqueuse (on ajoute entre 300 et 1000 µl d'eau bi-distillée selon la grosseur de la pelote). On laisse une nuit sur un agitateur-rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

VII- Représentation schématique de la séquence de l'exon 2 de la *POLG1* avec localisation de la région d'intérêt et les amorces utilisées pour l'amplification

(Illustration faite avec des données recueillies sur Ensembl Genome Browser).

5'GATTTGGGGTGAAGGCAGGCATGGTCAAACCCATTTCCTGACA
 GGAGAGCAGAGACAGGACGTGTCTCTCTCCACGTCTTCCAGCCAGT
 AAAGAAGCCAAGCTGGAGCCCAAAGCCAGGTGTTCTGACTCCCAG
 CGTGGGGGTCCCTGCACCAACCATGAGCCGCCTGCTCTGGAGGAAGG
 TGGCCGGCGCCACCGTCGGGCCAGGGCCGGTTCCAGCTCCGGGGGCGC
 TGGGTCTCCAGCTCCGTCCCCGCGTCCGACCCCAGCGACGGGCAGCG
 GCGGGCGG**CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG**CAACAGC
 AGCCTCAGCAGCCGCAAGTGCTATCCTCGGAGGGCGGGCAGGTGCG
 GCACAACCCATTGGACATCCAGATGCTCTCGAGAGGGCTGCA**CGAG**
CAAATCTTCGGGCAAGGAGGGGAGATGCCCTGGCGAGGCCCGCGGTG
 CGCCGCAGC**GTCGAGCACCTGCAGAAGC**ACGGGCTCTGGGGGCAG
 CCAGCCGTGCCCTTGCCCGACGTGGAGCTGCGCCTGCCGCCCTCTA
 CGGGGACAACCTGGACCAGCACTTCCGCCTCCTGGCCCAGAAGCAGA
 GCCTGCCCTACCTGGAGGCGGCCAACTTGCTGTTGCAGGCCCAGCTG
 CCCCCGAAGCCCCCGGCTTGGGCCTGGGCGGAGGGCTGGACCCGGTA
 CGGCCCCGAGGGGGAGGCCGTACCCGTGGCCATCCCCGAGGAGCGG
 GCCCTGGTGTTCGACGTGGAGGTCTGCTTGGCAGAGGGA ACTTGCCC
 CACATTGGCGGTGGCCATATCCCCCTCGGCCTG.....3'

-  Amorces 2.1 F et R,  Région non codante,
 -  Amorces 2.2 F (le 2.2 R se trouve dans l'intron qui suit l'exon 2),
 -  Répétition de triplets CAG (10 dans la forme sauvage) (acide aminé 43 à 53),
 -  Début et fin de l'amplicon 2.1 (414 pb),
 -  Début de l'amplicon 2.2 (418 pb de l'extrémité 3' de l'exon 2 + 82 pb de l'extrémité 5' de l'intron suivant),
- Taille de l'exon 2 : 818 pb, de 935 à 1752 (219 acides aminés).**

VIII- Caractéristiques des marqueurs de taille utilisés pour visualiser les fragments d'amplification et/ou de restriction des gènes étudiés

(<https://lifescience.roche.com>) (Mise à jour Novembre 2015) (Consulté le 22-12-2015).

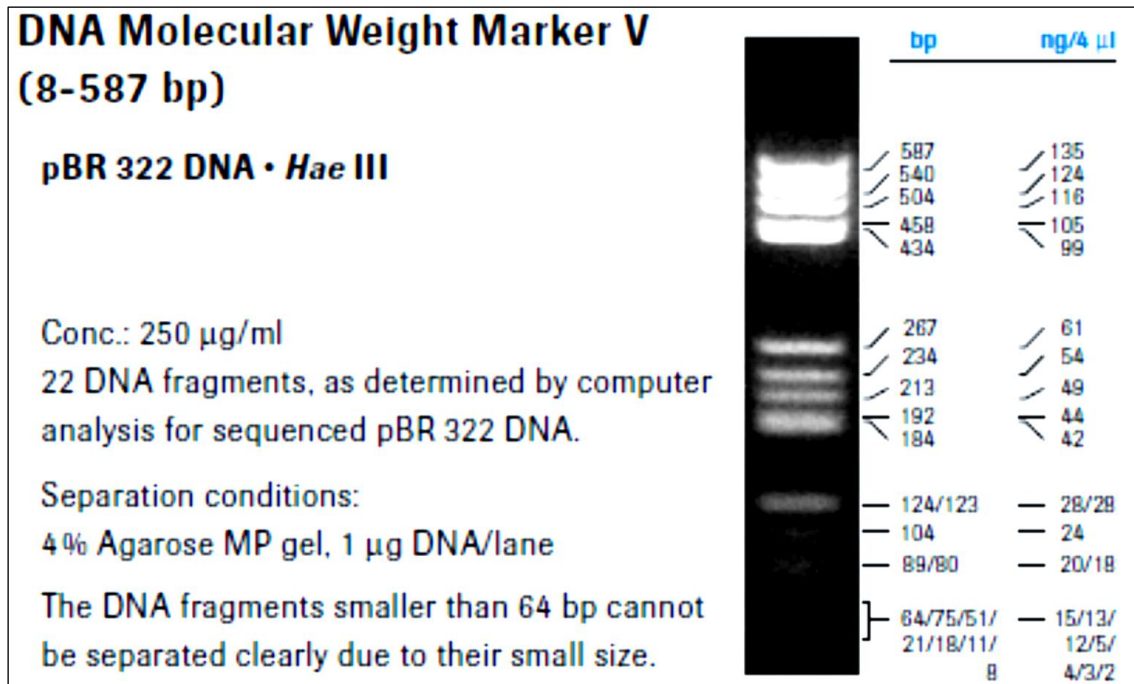


Figure 1 : Caractéristiques du marqueur de taille (Mar V) utilisé pour visualiser les amplicons 2.1 et 2.2 de l'exon 2 de la *POLG1*.

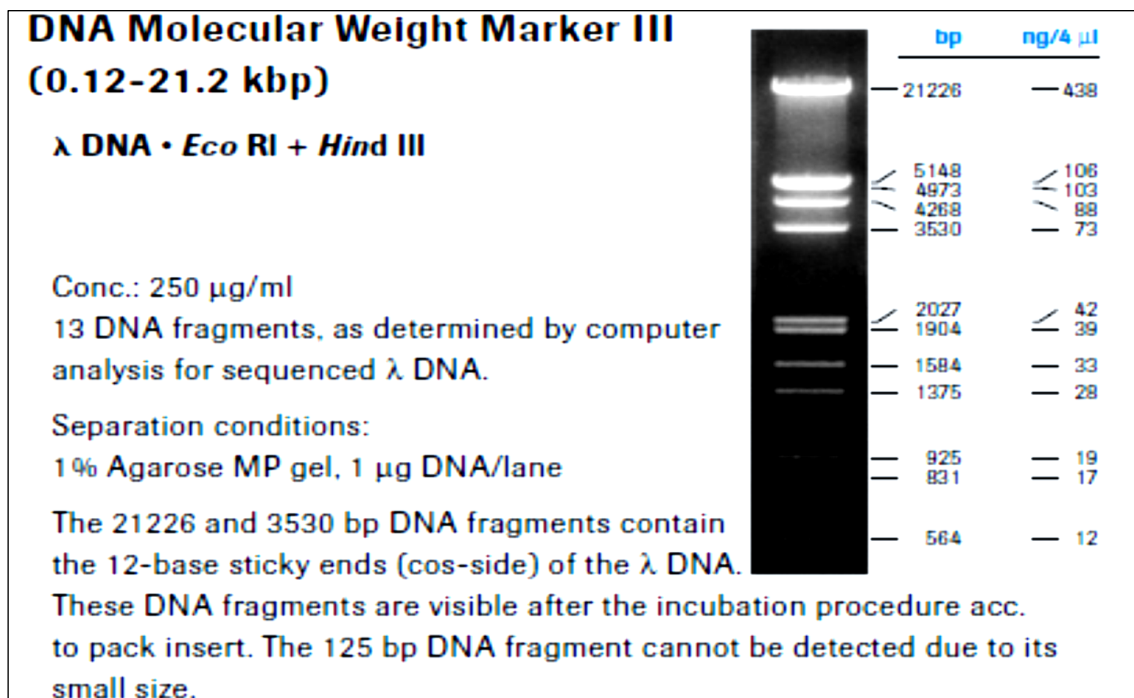


Figure 2 : Caractéristiques du marqueur de taille (Mar III) utilisé pour visualiser les amplicons XL1/XL2 et OF/BR de l'ADNmt.

DNA Molecular Weight Marker XIV

100 bp ladder

Conc.: 250 µg/ml - 16 DNA fragments

Separation conditions:

2% Agarose MP gel, 1 µg DNA/lane

The DNA fragment mixture shows a ladder with

15 DNA fragments and one DNA fragment of

2642 bp. The 500 and 1000 bp DNA fragment

are two to three times brighter, facilitating analysis of DNA fragments generated by PCR or restriction digest and separated on agarose gels.

The marker can be used in combination with the 50 bp ladder, 250 bp ladder and 500 bp ladder for precise size determination.

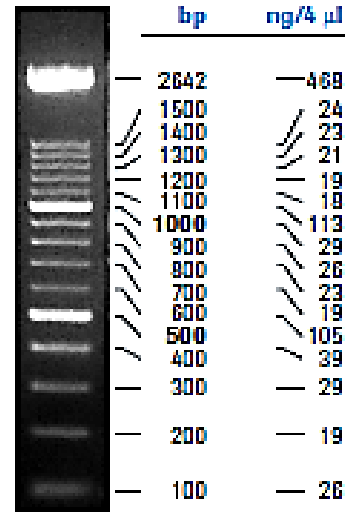


Figure 3 : Caractéristiques du marqueur de taille (Mar XIV) utilisé pour visualiser les produits de digestion de l'exon 7 de la *MTHFR* et la région 3' non codante du *CYP1A1*.

IX- Procédé de purification des produits de PCR par AMPure®

(<https://lifescience.roche.com>) (Mise à jour Novembre 2015) (Consulté le 22-12-2015).

Le kit Agencourt® AMPure® XP offre un procédé de purification des produits de PCR reposant sur la technologie d'immobilisation réversible sur phase solide (Solid Phase Reversible Immobilization ou SPRI®) servant à purifier les produits de PCR au moyen de billes magnétiques. Elle fournit une qualité supérieure d'amplicons sans rétention de sels ni d'autres produits indésirables. Il en résulte un ADN d'une pureté élevée.

Les billes d'Agencourt® AMPure® XP sont utilisées pour purifier les échantillons d'ADN simple ou double brins de plus de 100 pb, notamment des produits de PCR, et sans avoir recours à des étapes de centrifugation. Après immobilisation réversible de l'ADN sur une phase solide, les fragments sont retenus par des billes magnétiques puis élués.

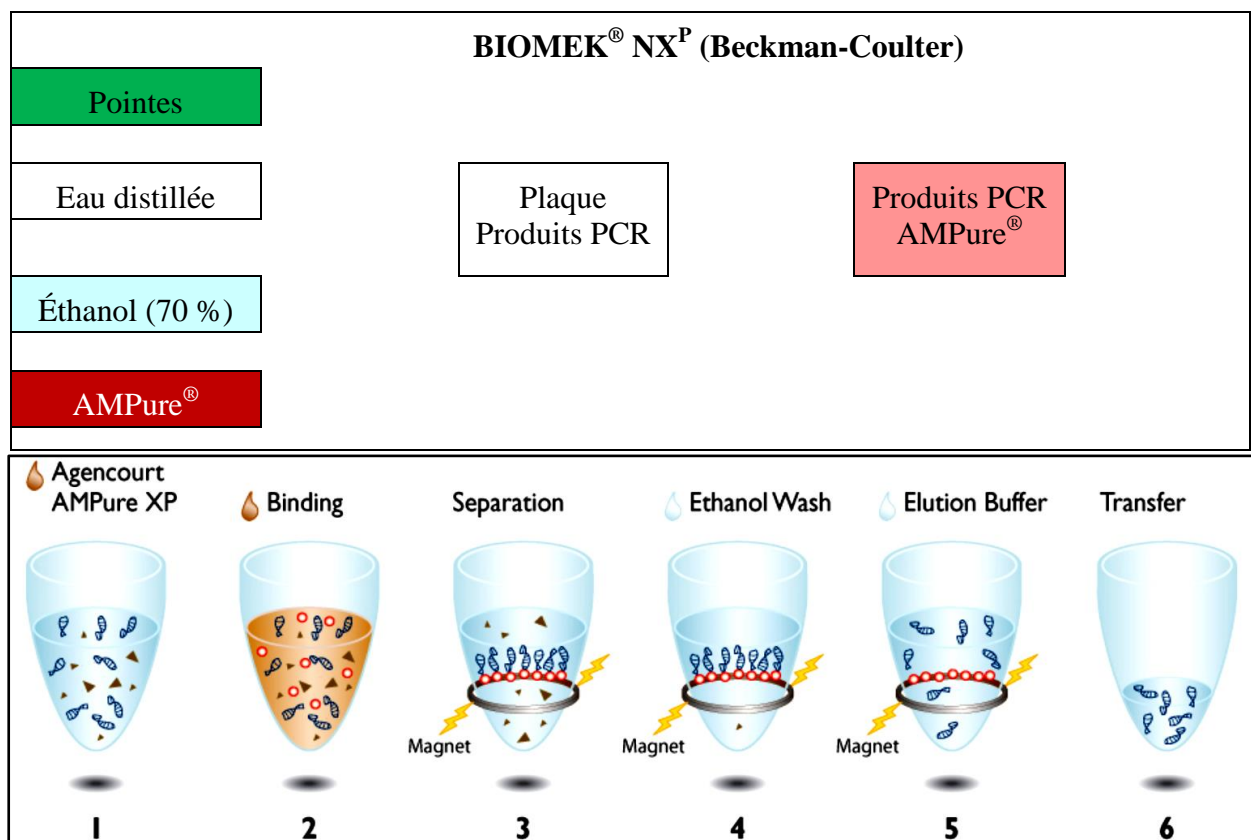


Figure : Descriptif du procédé de purification des produits de PCR en AMPure®.

(1) Ajout de 2,25 µl d'AMPure® pour 1 µl de produits de PCR, (2) Liaison des produits de PCR aux billes magnétiques, (3) Séparation des billes et des produits de PCR des contaminants, (4) Lavage des billes et des produits de PCR deux fois successives avec de l'éthanol à 70 % pour enlever les contaminants, (5) Éluion des billes du produit de PCR purifié, (6) Transfert dans la plaque séquenceur.

X- Principe de la réaction de séquençage utilisée (BigDye Terminators®)

(<https://thermofisher.com>) (Mise à jour Décembre 2015) (Consulté le 28-12-2015).

La réaction de Sanger repose sur l'incorporation aléatoire par l'ADN polymérase de di-désoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphates (ddNTPs) dits « interrupteurs de chaîne » (ou « Terminators » en Anglais) présents dans le milieu réactionnel. Ces ddNTPs diffèrent des dNTPs par leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des dNTPs est remplacée par une extrémité 3'H. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. L'allongement de la chaîne est alors interrompu (**Sanger et al., 1977**).

Le rapport spécifique ddNTPs/dNTPs et l'affinité de la polymérase pour chaque nucléotide sont optimisés de telle façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à toutes les positions possibles. L'élongation de chaque produit monobrin se termine par l'incorporation d'un ddNTP spécifique. Ici, chaque ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP et ddGTP) est marqué par un fluorochrome différent dont le spectre d'émission est spécifique.

Nous avons utilisé la technologie BigDye® Terminator version 1.1 (Applied Biosystems®) pour la réaction de séquençage. Elle repose sur un système de transfert d'énergie par résonance (Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTPs. Le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur. Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant entre 488 nm et 514,5 nm. Son énergie de fluorescence émise (515 à 520 nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichlororhodamine est différent pour chaque type de ddNTP.

Les BigDye Terminators® sont des ddNTPs modifiés par des groupes fluorescents transmetteurs d'énergie. À chaque base (A, T, G et C) est associée une longueur d'onde différente qui se retrouve symboliquement sur le chromatogramme sous forme de couleurs différentes. Chaque ddNTP BigDye Terminators® porte simultanément son fluorophore de couleur et le fluorophore FAM, amplificateur d'énergie (voir tableau ci-après).

Tableau : Caractéristiques des fluorochromes utilisées pour chaque nucléotide.

ddNTP	Dichlororhodamine utilisée	Spectre d'émission maximum	Couleur associée
A	dR6G	560 à 565 nm	Vert
T	dROX	615 à 620 nm	Rouge
C	dR110	530 à 535 nm	Bleu
G	dTAMRA	590 à 595 nm	Noir

La combinaison de l'AmpliTaq FS Fluorescent Sequencing[®] (AmpliTaq FS[®]) et des BigDye Terminators[®] permet d'obtenir des séquences de qualité. Cette enzyme a été spécialement développée pour le séquençage automatique utilisant les fluorophores BigDye Terminators[®].

XI- Procédé de purification des séquences par CleanSEQ®

(<https://lifescience.roche.com>) (Mise à jour Novembre 2015) (Consulté le 22-12-2015).

Il s'agit d'un système de purification des produits de séquençage (élimination des colorants). Le kit Agencourt® CleanSEQ® est une méthode reposant sur la technologie SPRI® (la même que celle exploitée avec AMPure®), technologie unique à billes magnétiques, destinée à purifier les produits de séquençage après une réaction de Sanger.

Le protocole ne comporte que 3 étapes, ne nécessite ni centrifugation, ni filtration et donne des séquences purifiées de haute qualité (appréciable sur le résultat du séquenceur). Le système Agencourt® CleanSEQ® apporte à l'utilisateur une méthode de purification extrêmement flexible, simple, facilitant l'automatisation et économique.

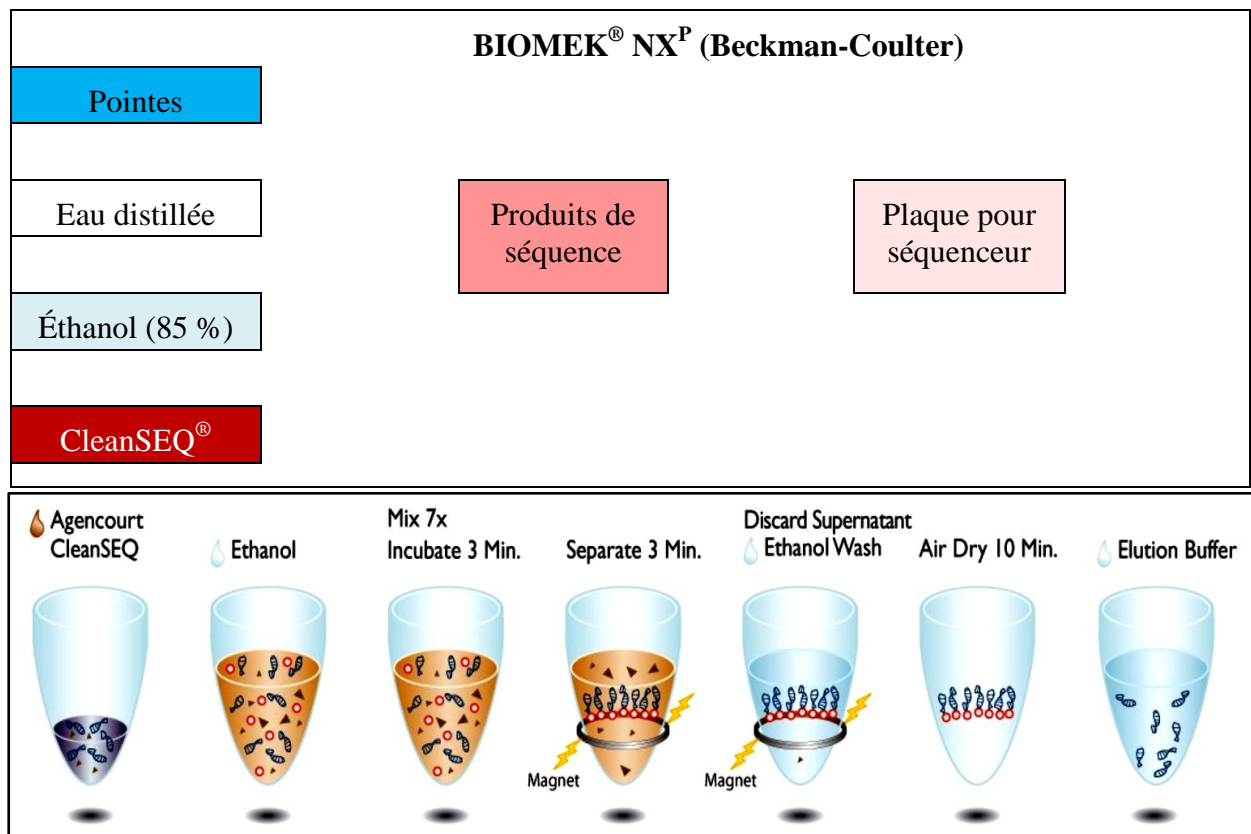


Figure : Descriptif du procédé de purification des séquences en CleanSEQ®.

(1) Ajout de 0,5 µl de CleanSEQ® pour 1 µl de produits de séquence, (2) Ajout de l'éthanol à 85 % (3) Agitation pendant 3 minutes, (4) Application d'un champ magnétique pendant 3 minutes pour la séparation des billes liées aux séquences des contaminants, (5) Lavage des billes liées aux séquences avec de l'éthanol à 85 % pour enlever les contaminants, (6) Séchage à l'air pendant 10 minutes, (7) Éluion des séquences purifiées et transfert dans la plaque du séquenceur.

XII - Principe de fonctionnement du séquenceur 3730xl

(www.lifetechnologies.com) (Mise à jour Juin 2015) (Consulté le 20-09-2015).

Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems®) considéré comme faisant partie de la première génération de séquenceurs à haut débit (commercialisé en 2002) qui fonctionnent sur le principe du Sanger mais en utilisant des fluorophores à la place de marqueurs radioactifs.

Cet appareil est caractérisé par sa grande sensibilité de détection grâce à l'utilisation d'une caméra CCD (Charge Couple Device) couplée à un système d'électrophorèse capillaire qui permet une grande rapidité de migration (obtention de 750 bases en 2h30) et une bonne automatisation (200 séquences en 30 heures sans intervention humaine). La longueur des capillaires est dépendante de l'activité utilisée (de 20 à 80 cm, nous avons utilisé des capillaires de 50 cm).

Seize capillaires sont physiquement associés pour permettre la co-migration simultanée de seize échantillons par cycle de séquençage ou "run". Pour effectuer la migration des 96 échantillons (plaque de séquences contenant 95 échantillons + 1 blanc) 6 runs successifs de 16 échantillons seront nécessaires. Le séquenceur est piloté par une plate-forme PC qui commande pour chaque run : le remplissage des capillaires, l'injection des échantillons, la détection et l'analyse. Un plateau articulé ou "auto-sampler" supporte les plaques 96 puits contenant les réactions de séquence purifiées, les réservoirs de tampon et d'eau nécessaires respectivement à la migration électrophorétique, au rinçage et à l'évacuation des déchets. Le plateau se déplace dans deux dimensions et assure ainsi le transfert des seize capillaires entre les différents constituants. Un cycle de séquençage comprend les étapes suivantes :

- 1. Rejet de l'ancien polymère :** le polymère est stocké dans deux seringues, l'une sert de réserve, l'autre permet le remplissage des capillaires. L'injection de polymère neuf sous pression (50 à 60 µl par run) dans les capillaires est effectuée au début de chaque run. Le polymère de la migration précédente est chassé dans la cuve servant de poubelle. Lors du remplissage, le polymère va venir effectuer un "coating" dynamique. Il va neutraliser les charges positives de la silice dont sont composés les capillaires pour empêcher, par la suite, la fixation de l'ADN monobrin (chargé négativement) aux parois des capillaires.
- 2. Placement des plaques de dépôt :** après évacuation des déchets dans la poubelle, l'auto-sampler présente aux capillaires la plaque de 96 puits pour l'électro-injection des échantillons.
- 3. Injection électrocinétique :** les capillaires descendent dans la plaque 96 puits contenant les produits de la réaction de séquence. Une différence de potentiel (ddp) d'injection de 1,5 kilo Volt (kV) est appliquée pendant quelques secondes (20 à 40 sec), elle permet aux molécules chargées de migrer dans les capillaires.
- 4. Rinçage des capillaires :** l'auto-sampler vient placer les capillaires dans de l'eau pour les rincer.

XIII- Principe de la PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

(Higuchi *et al.*, 1992 ; Higuchi *et al.*, 1993 ; Heid *et al.*, 1996 ; Bustin *et al.*, 2005).

La PCR quantitative en temps réel (Real Time-quantitative PCR ou RT-qPCR) est une application de la PCR classique qui combine l'amplification avec la détection et la quantification d'un signal fluorescent. Elle permet de suivre en continu, « en temps réel », le processus d'amplification en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo-formés. Cela est rendu possible grâce à l'utilisation d'un fluorochrome particulier, le SYBR Green® (technologie de marquage par intercalation spécifique dans l'ADN double brin), ayant la propriété de se lier à l'ADN double brin, au niveau du sillon mineur (à ne pas confondre avec un agent intercalant), émet peu de fluorescence en solution mais a la propriété de devenir fluorescent durant l'élongation, exclusivement lorsqu'il se fixe à de l'ADN double brin.

Au début de l'amplification, le mélange réactionnel contenant l'ADN est dénaturé, les amorces et le fluorochrome non liées. Pendant l'étape d'élongation, le nombre de molécules SYBR Green® liées à l'ADN synthétisé augmente entraînant ainsi un accroissement de la fluorescence, qui est mesurée à la fin de chaque cycle en utilisant un spectro-fluorimètre à la longueur d'onde de 521 nm (**figure 1**).

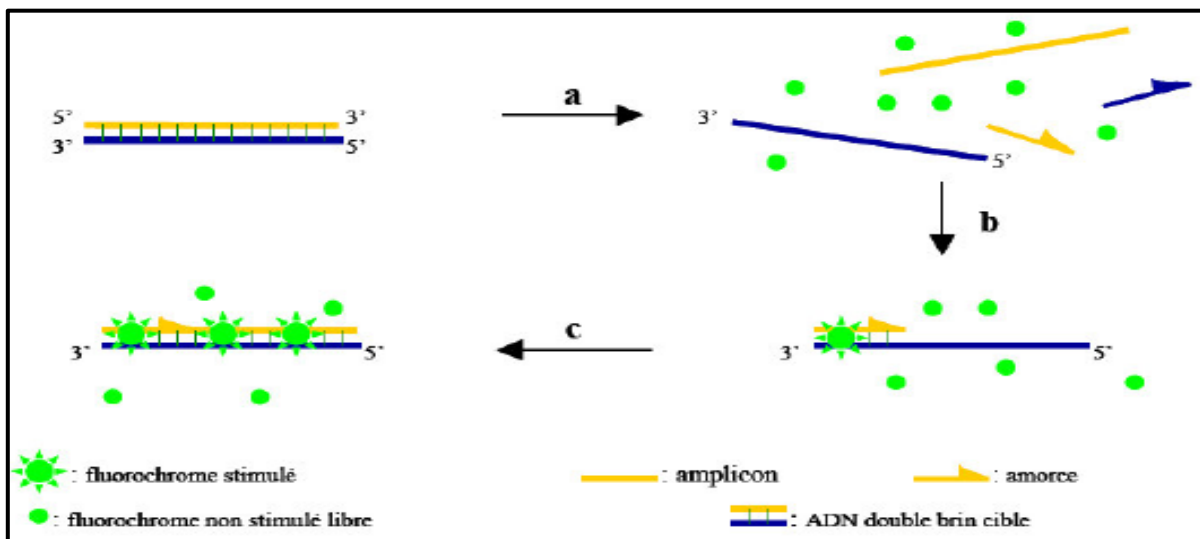


Figure 1 : Principe de fonctionnement du SYBR Green®.

(a) Durant la dénaturation, le SYBR Green® libre exhibe peu de fluorescence.

(b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient aux doubles brins d'ADN naissants, il en résulte une émission de fluorescence lors de l'excitation.

(c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient aux brins naissants et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel.

Le SYBR Green[®] présente l'avantage d'être applicable à tout couple d'amorces et de fournir un signal fort, d'autant plus que la taille des amplicons est importante. Il présente néanmoins le désavantage de n'être pas spécifique de l'amplicon d'intérêt. Si la PCR n'a pas été correctement mise au point, il est possible que les amorces forment des dimères, ou bien qu'un amplicon non spécifique soit amplifié en raison d'une faible spécificité des amorces de PCR. Dans ce cas, le signal enregistré ne sera plus proportionnel à la quantité d'amplicons spécifiques et les résultats s'avèreront ininterprétables. Pour vérifier que le bon gène a bien été amplifié, on étudie la courbe de fusion (**figure 2**). En effet, chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion spécifique (ou "melting temperature" en Anglais), définie comme la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme de double brin, l'autre moitié sous forme de simple brin.

Une courbe de dissociation (ou courbe de fusion) est obtenue en traçant la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température ; la température de fusion d'un ADN double brin correspond à un pic sur cette courbe.

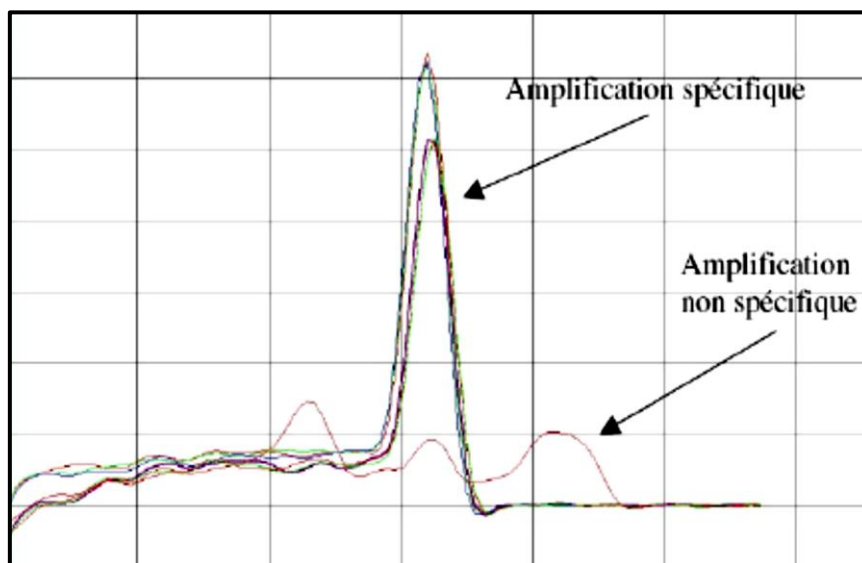


Figure 2 : Courbe de dissociation.

Pour quantifier l'ADN, une courbe représentant la fluorescence émise en fonction du nombre de cycles est ainsi obtenue. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans le milieu.

Elle franchit une valeur fixée par l'appareil à un cycle de PCR appelé cycle seuil ("Cycle threshold" (Ct) en Anglais) qui correspond au nombre de cycles d'amplifications nécessaires pour obtenir un signal fluorescent statistiquement significatif par rapport au bruit de fond permettant ainsi le calcul de la quantité initiale d'ADN utilisée (**figure 3**).

Donc, plus il y a de matrices à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycle requis pour atteindre le point Ct.

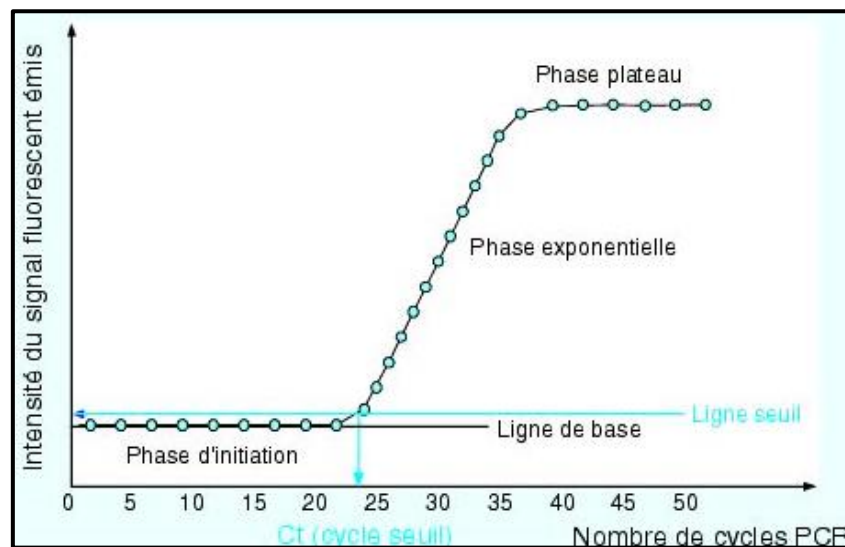


Figure 3 : Représentation d'un profil d'amplification PCR en temps réel.

Ce point apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau d'une PCR classique (ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible). La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues (gamme d'étalonnage à partir d'ADN synthétique de quantité définie).

Lors de la PCR, les produits servent de matrice pour la réaction subséquente suivant une amplification théoriquement quadratique : $N = N_0 \times 2^n$, où N_0 est le nombre initial de molécules, n le nombre de cycle et N le nombre de molécules amplifiées.

Cette amplification théorique dépend dans la réalité d'une efficacité d'amplification E , ou proportion moyenne de molécules produites à chaque cycle ($E = 2$ idéalement et $E = 1$ si aucune molécule n'est produite). Expérimentalement, E varie entre 1,78 et 1,97 ($N = N_0 \times E^n$). Soit sous forme logarithmique : $\text{Log}N = \text{log}N_0 + n \times \text{log}E$.

À partir d'une courbe expérimentale du nombre de molécules amplifiées N en fonction du nombre de cycle, il est possible d'en déduire la valeur de N_0 c'est-à-dire le nombre initial de molécules. La formule donnant l'efficacité de la PCR en temps réel peut être calculée lors de l'établissement d'une gamme étalon : $E\% = (10^{(-1/\text{pente})} - 1) \times 100 \%$ (figure 4).

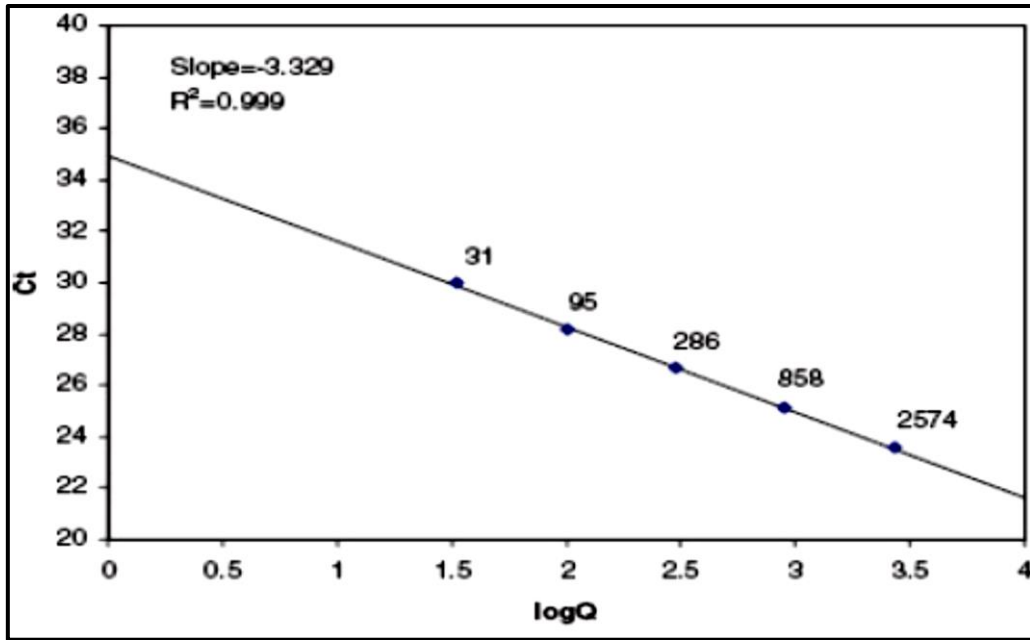


Figure 4 : Exemple de courbe standard en PCR en temps réel.

Résumés

علم الوراثة الميتوكوندرية لاضطرابات الخصوبة عند الرجال.

الملخص :

تلعب الميتوكوندري دورا أساسيا في استقلاب الطاقة، التوازن الداخلي وموت الخلايا المبرمج. هذه الوظائف هي في جزء تحت الضبط الجيني الميتوكوندري الذي يعتبر اساس الوراثة الهولوية التي تنتقل إلى الأبناء عبر الأم فقط. مشاركة هذه العضيات في التناسل البشري هو مفهوم جديد نسبيا يثير الاهتمام العلمي و الطبي المتزايد. التشوهات سواء كانت نوعية او كمية للحمض النووي الميتوكوندري تم ربطها مع اضطرابات خصوبة الرجال.

انخفاض الخصوبة يخص من 10 إلى 15 % من الأزواج الذين لديهم رغبة في الإنجاب، تم العثور على عنصر ذكري في ما يقارب نصف من هذه الحالات و في نسبة كبيرة منها قد تم التعرف على أساس وراثي، كروموسومي أو جيني.

خلال هذا البحث العلمي و في جزئه الأول تم دراسة تعدد الأشكال الجيني عند الإنسان لمختلف الجينات ومن بينها :

MTHFR A1298C و *T3801C CYP11A1, (CAG) n POLG1* ودورها المحتمل كعوامل انخفاض الخصوبة عند الرجال في عينة من سكان الجزائر باستعمال تقنية RFLP. في دراستنا يبدو أن تعدد الأشكال المدروس ل *MTHFR* و *CYP11A1* لا يرتبط مع انخفاض الخصوبة عند الرجال ولكن بالنسبة لمتغير *POLG1* نتائجا تظهر أن المتغير المدروس يشارك في ضعف الخصوبة الذكري.

في الجزء الثاني من هذا البحث قمنا بالبحث النوعي عن للتغيرات الجينية الميتوكوندرية عن طريق تحليل طفرات الحذف بواسطة تقنية PCR الطويلة وقمنا كذلك بالتقييم الكمي للجينوم الميتوكوندري المستخرج من الكريات البيضاء باستعمال تقنية PCR الكمية. إن الحذف للحمض النووي الميتوكوندري لا يبدو مرتبطا بهذا الاضطراب المدروس ولكن تقييم مستوى الحمض النووي الميتوكوندري في الكريات البيضاء بالنسبة لمستوى الحمض النووي يرجح تدخلها في اضطرابات الخصوبة عند الذكور خاصة المصابين منهم بانعدام الحيوانات المنوية او قلة حركتها.

تساعد البيولوجيا الجزيئية في اكتشاف مسببات في اضطرابات الخصوبة عند الذكور غير مستكشفة حتى الآن دون التشكيك في القيمة التفسيرية لبعض المسببات المعترف بها. هذا البحث يفتح آفاقا جديدة مرتبطين بهذا المظهر الميتوكوندري الجزيئي المجهول الذي يستطيع في المستقبل إدخال تغييرات عميقة في فهم النهج الوراثي لاضطرابات الخصوبة عند الرجال.

الكلمات المفتاحية : الميتوكوندري, تعدد الأشكال الجيني, اضطرابات الخصوبة عند الرجال, البيولوجيا الجزيئية.

Mitochondrial genetic of human male infertility.

Abstract:

Mitochondria play a central role in energy metabolism, homeostasis and apoptosis. These functions are in part under the control of a mitochondrial genome, support of cytoplasmic heredity, whose transmission is only maternal. The involvement of these organelles in human reproduction is a relatively new concept that arouses scientific and medical interest. Abnormalities both qualitative and quantitative of mitochondrial DNA (mtDNA) have been associated with male fertility disorders.

Infertility concerns 10 to 15 % of couples wishing to have a child, a male component is found in almost half of cases. In a significant proportion of these cases, a known genetic basis, chromosomal or gene, sometimes transmitted from the parents, is involved.

In this work, in a first part, different genetic polymorphisms in humans: (CAG)_n *POLG1*, T3801C *CYP11A1* and *MTHFR* A1298C, and their role as potential risk factors for male infertility in an Algerian population cohort were studied by sequencing or RFLP. Our results show that the variants described at the *MTHFR* and *CYP11A1* genes are not associated with male infertility unlike that of *POLG1* which appears to be involved in this dysfunction.

In the second part of our work, we have prospected qualitative alterations of mitochondrial genome by analysis of macro-deletions by long PCR and quantitative by quantification of leukocyte mtDNA rate by real-time quantitative PCR (mitochondrial DNA vs nuclear) in idiopathic male infertility. The mtDNA deletion does not appear to be associated with this disorder but the assessment of the level of leukocyte mtDNA likely suggests the involvement of this parameter in male infertility especially in azoospermic and asthenospermic men.

Molecular biology has led to the discovery of unexplored etiologies until now without denigrating the clinical and biological explanatory value of many recognized etiologies. This mitochondrial molecular appearance misunderstood opens up new perspectives and may in the future introduce profound changes in the genetic approach to male infertility.

Keywords: mitochondria, polymorphism, male infertility, molecular biology.

Année universitaire : 2015 - 2016

Présentée par : REZGOUNE Mohamed Larbi

Génétique mitochondriale des infertilités masculines

Thèse pour l'obtention du diplôme de Docteur en Sciences en Génétique Moléculaire

La mitochondrie joue un rôle central dans le métabolisme énergétique, l'homéostasie et l'apoptose. Ces fonctions sont en partie sous la dépendance d'un génome, support de l'hérédité cytoplasmique dont la transmission est uniquement maternelle. L'implication de ces organites dans la reproduction humaine est une notion relativement récente qui suscite un intérêt scientifique et médical croissant. Les anomalies tant qualitatives que quantitatives de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ont été associées à des troubles de la fertilité masculine.

L'infertilité concerne 10 à 15 % des couples désireux d'avoir un enfant, une composante masculine est retrouvée dans près de la moitié des cas. Dans une proportion importante de ces cas, une base génétique, chromosomique ou génique connue, parfois transmise par les parents, est en cause.

Au cours de ce travail, dans une première partie, différents polymorphismes génétiques chez l'homme : **(CAG)_n POLG1**, **T3801C CYP11A1** et **A1298C MTHFR**, et leurs rôles comme facteurs de risque potentiels de l'infertilité masculine dans une cohorte de population algérienne ont été étudiés par **séquençage** ou **RFLP**. Nos résultats montrent que les variants décrits au niveau des gènes de la **MTHFR** et du **CYP11A1** ne sont pas associés à l'infertilité masculine contrairement à celui de la **POLG1** qui semble être impliquée dans son dysfonctionnement.

Dans une deuxième partie, nous avons prospecté la part des **altérations qualitatives du génome mitochondrial par analyse des macro-délétions par PCR longue et quantitatives par quantification des taux leucocytaires de l'ADNmt par PCR quantitative en temps réel (ADN mitochondrial vs ADN nucléaire)** dans les infertilités masculines idiopathiques. Les délétions de l'ADNmt ne paraissent pas être associées à ce trouble mais l'évaluation du taux d'ADNmt leucocytaire suggère vraisemblablement l'implication de ce paramètre dans l'infertilité masculine particulièrement chez les hommes azoospermiques et asthénozoospermiques.

La biologie moléculaire a permis de retrouver des étiologies à une échelle non explorée jusqu'à présent sans pour autant remettre en cause la valeur explicative de certaines étiologies reconnues. Elle ouvre de nouvelles perspectives. Cet aspect moléculaire mitochondrial méconnu pourra dans l'avenir introduire de profonds changements dans l'approche génétique de l'infertilité masculine.

Mots-clefs : mitochondrie, polymorphisme, infertilité masculine, biologie moléculaire.

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire (Université Constantine 3),

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Président du jury : ROUABAH Abdelkader (Professeur - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Directrice : SATTA Dalila (Professeur - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Co-directeur : SLAMA Abdelhamid (Professeur - APHP Paris).

Examineurs : ABADI Noureddine (Professeur - Université Constantine 3),

BELAALOUI Ghania (Maître de conférences A - Université El Hadj Lakhdar de Batna),

BENDJEDDOU Dalila (Professeur - Université 8 Mai 1945 Guelma),

BOUDA Abdennacer (Maître de conférences A - Université Constantine 3).