



ⵜⴰⵎⴰⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⴰⵎⴰⵔ ⵏ ⵙⴷⵉ ⴰⵎⴰⵔ ⵏ ⴰⵎⴰⵔ
Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

Royaume du Maroc المملكة المغربية

كلية الطب والصيدلة
ⵜⴰⵎⴰⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⴰⵎⴰⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⴰⵎⴰⵔⴰⵏⵜ
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2019

Thèse N°207/19

**LES ASPECTS GENETIQUES DE L'INFERTILITE MASCULINE :
EXPERIENCE DE L'UNITE DE GENETIQUE MEDICALE
DU CHU HASSAN II DE FES
(A propos de 118 cas)**

THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 27/11/2019

PAR

Mme. BENNANI Kenza

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

MOTS-CLÉS :

Infertilité masculine- génétique -klinefelter -microdélétion AZF- gène AURKC

JURY

M. MELHOUF MOULAY ABDELILAH
Professeur de Gynécologie Obstétrique

PRESIDENT

M. OULDIM Karim
Professeur de Génétique

RAPPORTEUR

M. EL AMMARI JALAL EDDINE.....
Professeur d'Urologie

Mme. ERRARHAY SANAA.....
Professeur de Gynécologie Obstétrique

JUGES

Mme. BENNIS SANA.....
Professeur habilité de Biologie cellulaire

PLAN

INTRODUCTION.....	10
I- Définitions- Epidémiologie.....	12
II- Rappels	14
1- Anatomie et Histologie de l'appareil génital masculin.....	14
1.1- Généralités	14
1.2- Les testicules.....	16
1.3- Organes Génitaux annexes	16
1.3.1- Les voies spermatiques	16
1.3.2- Les glandes annexes.....	21
1.4- Organes génitaux externes.....	24
2- Embryologie de l'appareil génital masculin.....	26
a- Facteurs de détermination du sexe	26
b- Formation des gonades chez l'embryon.....	28
c- Apparition des voies génitales	30
d- la différenciation des organes génitaux externes.....	30
3- Histologie fonctionnelle et régulation de l'appareil de reproduction.	32
3.1- Histologie fonctionnelle des testicules	32
3.1.1- Les tubes séminifères.....	32
3.1.1.1 L'enveloppe péri tubulaire	32
3.1.1.2 Les cellules de Sertoli	34
a- Rôle structural.....	34
b- Rôle dans la progression des cellules germinales.....	34
c- Rôle trophique	35
d- Rôles sécrétoires.....	35
3.1.1.3 La spermatogénèse	37
a- La phase proliférative	38
b- La phase méiotique.....	39

c- La spermiogénèse	41
d- Le spermatozoïde	43
3.2- L'espace interstitiel et sa fonction	48
3.3- Régulation de la spermatogenèse	49
a- Régulation hormonale	49
b- La régulation paracrine	52
c- La Puberté et la reproduction	53
III- Les mécanismes de l'infertilité masculine.....	54
1- Les causes hormonales dite pré-testiculaires	54
2- Les causes dites testiculaires	56
3- Les causes dites post - testiculaire	56
4- Les Infertilités masculine idiopathiques	57
IV- Les Facteurs de risque de l'infertilité masculine	57
1- L'Âge.....	57
a- Modifications histologiques	57
b- Modifications hormonales.....	58
c- Modification des paramètres spermatiques	58
2- La chaleur.....	58
3- Le tabac.....	59
4- L'alcool et diverses drogues	59
5- Les médicaments	59
6- Les infections du tractus génital masculin	60
6.1- Infections virales	61
6.2- Infections bactérienne	62
7- Les traumatismes	63
8- Torsion du pédicule spermatique	64
9- L'auto-immunisation anti-spermatozoïde	64

10-	La varicocèle.....	64
11-	La cryptorchidie.....	66
12-	Le Cancer du testicule.....	66
13-	Les traitements du cancer	67
	13.1- Impact de la radiothérapie sur la fertilité	67
	13.2- Impact de la chimiothérapie sur la fertilité.....	67
14-	Les expositions professionnels	68
V-	La démarche diagnostique avant le bilan génétique	68
1-	L'interrogatoire.....	69
	1.1 Histoire reproductive	69
	1.2 Facteurs de risques.....	70
2-	Examen clinique	70
	2.1. Examen physique général	70
	2.2. Examen urogénital.....	70
	2.2.1 Examen des organes génitaux externes	70
	a- L'examen de la verge	70
	b- L'examen des testicules.....	71
	2.2.2 Examen des voies génitales	71
	a- La palpation des épидидymes	71
	b- La palpation des canaux déférents	71
	2.2.3 Le toucher rectal.....	71
3-	Bilan d'exploration de la fonction de reproduction masculine	72
	3.1- Bilan spermatique.....	72
	3.1.1- Spermogramme.....	72
	3.1.1.1 Analyse macroscopique	73
	3.1.1.2 Analyse microscopique.....	74
a-	Concentration et nombre de spermatozoïdes	74

b- La mobilité.....	76
c- La Vitalité	76
3.1.2 Spermocytogramme	77
3.1.2.1. Les anomalies morphologiques.....	77
a- Classification de Kruger	77
b- Classification de David modifiée.....	78
3.1.2.2. Intérêt clinique de l'analyse cyto-morphologique des spermatozoïdes	81
3.1.3. Tests de migration-survie	81
3.1.4- Bilan d'auto-immunisation anti-spermatozoïdes	83
3.1.5- La Spermoculture.....	83
3.1.6- La Biochimie du plasma séminal.....	84
3.2- la Recherche d'une éjaculation rétrograde.....	85
3.3- Bilan hormonal	85
a- Dosage sérique de la testostérone	85
b- Dosage de l'inhibine B.....	86
c- Dosage de la FSH.....	86
d- Dosage de la prolactine	87
3.4- Bilan radiologique.....	87
a- Echographie-doppler couleur du contenu scrotal.....	89
b- Echographie endo-rectale et imagerie par résonance magnétique du carrefour prostatovésiculodéférentiel avec antenne endo-rectale....	89

MATERIEL ET METHODES.....	89
I- Caryotype métaphasique sur sang	90
II- Recherche de la présence du locus <i>SRY</i> par hybridation in situ en fluorescence (FISH.....	93
III- Recherche de la micro délétion du chromosome Y	95
IV- Recherche de la mutation du gène <i>AURKC</i>	104
RESULTATS	114
I- Description épidémiologique globale	115
1- La répartition selon l'âge	115
2- La répartition selon de type d'infertilité.....	116
3- La répartition selon la durée de l'infertilité	116
4- La répartition selon le résultat du spermogramme.....	116
5- La répartition selon le mécanisme de l'infertilité.....	117
II- Les résultats des Tests génétiques réalisés.....	117
1- La répartition selon le résultat du caryotype	117
2- Les résultats de la FISH	119
3- Les résultats de la recherche de la micro délétion AZF	120
4- Les résultats du Séquençage de l'exon 3 du gène <i>AURKC</i>	120
III- Les résultats spécifiques des patients avec syndrome de Klinefelter.....	122
1- La répartition selon l'âge	122
2- La répartition selon la durée de l'infertilité	122
3- Les résultats du spermogramme	123
4- L'estimation du volume testiculaire	123
5- La présence d'une gynécomastie.....	123
6- La présence d'un phénotype « grande taille	123
7- La présence d'une Cryptorchidie	123
8- La présence d'un micro pénis.....	123

9-	La présence d'une dysfonction érectile.....	123
10-	La présence d'une baisse de la libido	123
11-	La présence d'une hypo-pilosité	124
12-	Le taux de testostérone sérique	124
13-	Le Taux de l'hormone FSH	124
14-	La Présence associée d'une varicocèle	124
IV-	Les résultats spécifiques des patients avec caryotype normal.....	124
1-	La répartition selon l'âge	124
2-	La répartition selon la durée de l'infertilité	124
3-	La répartition selon le résultat du spermogramme.....	125
4-	La répartition selon la présence de facteurs de risque non génétiques décrits.....	125
5-	Le taux de testostérone sérique	126
6-	Le Taux de l'hormone FSH	127
7-	Des Observations particulières.....	127
	DISCUSSION	128
I-	Les insuffisances testiculaires	129
1-	La baisse de la production des spermatozoïdes.....	129
1.1.1-	Les anomalies chromosomiques.....	130
1.1.2-	Les anomalies du nombre de chromosomes.....	132
1.1.1.1-	Le Syndrome de Klinefelter.....	133
a-	Le caryotype	133
b-	La physiopathologie du syndrome de klinefelter	134
c-	Le tableau clinique.....	136
d-	le Bilan hormonal.....	138
e-	Echographie scrotale.....	138
1.1.1.2-	Le caryotype 47,XYX	138

1.1.1.3– Estimation de l'aneuploïdie au niveau des spermatozoïdes et du risque de non-disjonction	139
1.1.3– Les anomalies de structure chromosomique	139
a– Les anomalies chromosomiques équilibrées.....	139
b– Les microdélétions du chromosome Y	146
c– le syndrome de la chapelle.....	148
1.1– Les anomalies mono géniques	148
a– Causes autosomiques récessives.....	148
b– Causes liée au chromosome X.....	150
c– Les variations du nombre de copies (CNV.....	151
d– Les causes dominantes autosomales et liées à l'X – approche du gène candidat.....	152
e–L'approche des études d'association pangénomique (GWAS	153
2– Les anomalies de la morphologie ou de la fonction des spermatozoïdes..	154
2.1– Les anomalies de la tête du spermatozoïde.....	155
a– Spermatozoïdes multi flagellaires à tête large.....	155
b– la globozoospermie	160
c– Spermatozoïdes acéphaliques	163
2.2– Anomalies du flagelle et de la motilité des spermatozoïdes.....	163
2.2.1– L'infertilité masculine associée a la dyskinésie ciliaire primaire	
2.2.2– les gènes impliqués dans l'asthénozoospermie isolée	167
a– Les anomalies morphologiques multiples du flagelle du spermatozoïde.....	167
b– Asthénozoospermie et gene <i>SEPT12</i>	170
c– Anomalie de CATSPER.....	170
d– Anomalie du gene <i>SLC26A8</i>	171
2.3– Échec d'activation des ovocytes.....	

3- Épigénome et infertilité masculine	173
3.1- les troubles de méthylation de l'ADN	176
3.2- Les anomalies du remplacement des histones par les protamines au cours de la spermiogenèse	178
3.3- Les ARN non codants.....	181
3.4- Les analyse des anomalies épigénétiques du spermatozoïde	182
a- Indice de méthylation	182
b- Décondensation de la chromatine spermatique	183
c- Index de fragmentation de l'ADN Spermatique	183
3.5- Interactions de l'épigénome avec l'environnement.....	183
II- Les causes pré-testiculaires le l'infertilité masculine	184
1- Généralités	184
2- Les Formes de l'hypogonadisme hypo gonadotrope congénital.....	185
3- La Génétique de l'HHC	186
4- Traitement de l'HHC	192
III- Les causes obstructives post-testiculaires	194
1- Anomalies du gène <i>ABCC7</i>	194
2- Les mutations du gène <i>ADGRG2</i>	195
IV- Tableau récapitulatif.....	196
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	200

INTRODUCTION

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'infertilité est définie par l'absence de conception après au moins 12 mois de rapports sexuels non protégés. Elle touche environ 80 millions de personnes dans le monde et environ un couple sur six est confronté à une infertilité primaire ou secondaire.

Elle constitue de nos jours un réel problème de santé publique du fait de sa prévalence, de la généralisation de sa répartition, des difficultés inhérentes à sa prise en charge et de ses répercussions psychologiques et sociales. En effet, c'est une affection qui a des répercussions morales assez complexes respectivement sur l'individu, la famille, et la société notamment en ce qui concerne le dynamisme conjugal, surtout dans notre contexte, où la procréation est l'un des buts principaux du mariage. Cependant, la non procréation demeure l'une des causes principales de divorce au Maroc, malgré les progrès récents dans le diagnostic précoce et la prise en charge des couples infertiles.

Dans au moins la moitié des cas, l'infertilité du couple est d'origine masculine isolée ou mixte [2], cette proportion reste probablement sous-estimée par manque de dépistage et/ou de diagnostic malgré une accessibilité ainsi qu'une facilité de la réalisation du bilan spermatique qui constitue la pierre angulaire de l'exploration de l'infertilité masculine. Mais paradoxalement, dans notre société, on attribue encore volontiers l'infertilité du couple à la femme. Lorsqu'un couple n'arrive pas à concevoir, c'est la femme qui subit en premier lieu la majeure partie des investigations, elle est même parfois traitée avant que son partenaire ne soit évalué. Il est donc capital de conjuguer les efforts entre biologistes (embryologistes, généticiens et polyvalents) et cliniciens (urologues, gynécologues, endocrinologues et généralistes) pour assurer à nos citoyens une prise en charge globale permettant, d'un côté, de faire un diagnostic précis et d'un autre, d'ouvrir la voie à une thérapeutique adéquate.

De nos jours, un homme produit en moyenne deux fois moins de spermatozoïdes que son homologue d'il y a 50 ans (diminution de 2% par an). Dans ce contexte, les scientifiques cherchent à déterminer la part de responsabilité revenant aux évolutions démographiques, aux techniques médicales de diagnostic, au mode de vie, aux facteurs environnementaux et surtout à la génétique.

À travers une étude descriptive transversale de 118 cas d'infertilité masculine adressés à l'unité de génétique médicale du CHU Hassan II entre Septembre 2009 et Septembre 2019, l'objectif de notre travail est d'étudier des aspects épidémiologiques de la génétique de cette affection dans notre contexte, de réaliser une revue de la littérature pour améliorer la prise en charge diagnostique de l'infertilité masculine et de promouvoir la recherche fondamentale dans ce domaine.

I-Définitions-épidémiologie

La fertilité est l'aptitude d'un couple à procréer. Elle est variable d'un couple à l'autre. L'infertilité est définie par l'organisation mondiale de la santé OMS par l'absence de conception après au moins 12 mois de rapports sexuels non protégés, ces rapports doivent être normaux en fréquence et en qualité à l'intérieur d'un couple vivant régulièrement ensemble.

L'hypofertilité est définie par une difficulté à concevoir, se traduisant par un allongement du délai nécessaire pour qu'une grossesse débute chez un couple donné, appelé « délai de conception ». La stérilité masculine est définie par l'incapacité totale et définitive de concevoir, à cause d'une étiologie évidente et non curable d'infertilité comme l'orchidectomie bilatérale par exemple, la notion de stérilité a changé depuis la possibilité de recueil des spermatozoïdes intra-testiculaires et intra épидидymaires [1].

On distingue l'infertilité masculine primaire lorsqu'un homme n'a jamais fécondé une femme (féconder signifie que la conception a eu lieu, indépendamment de l'évolution de la grossesse), de l'infertilité masculine secondaire lorsqu'un homme a fécondé une femme, indépendamment du fait qu'elle soit la partenaire actuelle, et indépendamment de l'évolution de la grossesse [1].

Pour mesurer l'infertilité, L'indicateur le plus fréquemment utilisé est la probabilité mensuelle de conception. Elle est considérée comme constante pour un couple donné sur une certaine période, mais différente d'un couple à l'autre. Au temps 0 de désir de grossesse, la moyenne de fécondabilité des couples est estimée à 25%, c'est-à-dire que les couples ont en moyenne 25% de chance de procréer par cycle. La fécondabilité fait intervenir un facteur temps essentiel à prendre en compte pour la prise en charge du couple. En effet les couples les plus fertiles obtiendront rapidement la grossesse et disparaîtront de la cohorte de départ. Au fur et à mesure des années, la proportion des couples infertiles deviendra de plus en plus importante avec une fécondabilité moyenne des couples restant diminuée. Ainsi il est estimé qu'après un an d'infécondité, la fécondabilité moyenne est de 12% : après 2 ans elle n'est plus que de 7.9% et après 5 ans, de 4% [3].

Globalement, la cause de l'infertilité est :

- d'origine féminine dans environ 30% des cas,
- d'origine masculine dans environ 20% des cas,
- d'origine mixte dans environ 40% des cas.
- L'infertilité reste inexpliquée dans un peu moins de 10% des cas.

En se basant sur les critères de la définition de l'OMS, l'infertilité concerne entre 15% à 25% des couples à travers le monde (un couple sur 4 à 7) [1]. Selon l'OMS, 186 millions de couples sont concernés dans les pays en voie de développement [1]. Au Maroc, selon le Collège marocain de fertilité, 15% des couples marocains, soit un total de 800000 personnes souffrent de l'infertilité. Au Maghreb, Les études et recherches attestent l'infertilité est d'origine masculine dans environ 30% des cas [4].

II- Rappels

1 – Anatomie et Histologie de l'appareil génital masculin [5]

1.1- Généralités :

La plupart des systèmes de l'organisme doivent fonctionner sans arrêt pour maintenir l'homéostasie. La seule exception est le système génital, qui semble « dormir » jusqu'à la puberté. La fonction génitale de l'homme est d'élaborer les gamètes, appelés spermatozoïdes, et de les introduire dans les voies génitales de la femme. L'appareil génital mâle est à cet effet constitué par un ensemble d'organes et de structures participant à la formation, la maturation et l'émission sous pression des différents constituants du sperme. Ces organes et structures sont (Figure 1) :

- Les testicules
- Les voies spermatiques excrétrices : les canaux efférents, l'épididyme et les canaux déférents.
- Les glandes annexes constituées par la prostate, les vésicules séminales et les glandes bulbo-urétrales ou glandes de Cowper.
- Les organes génitaux externes.

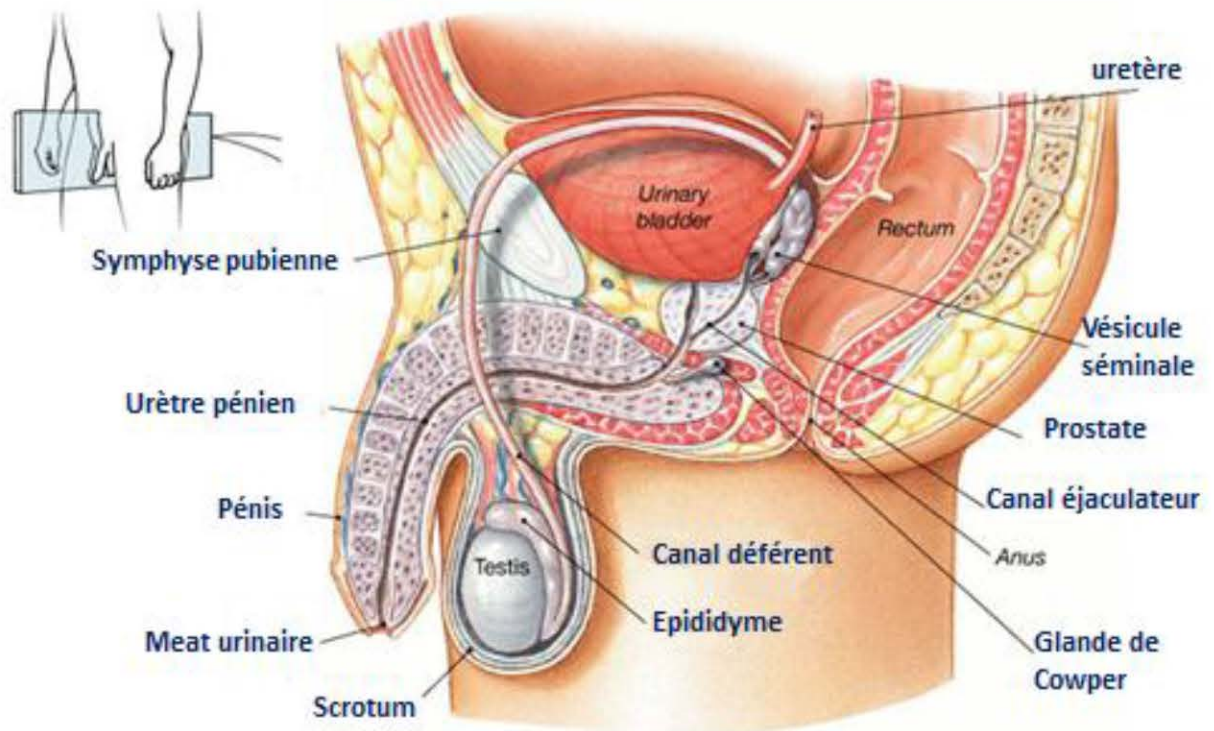


Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe sagittale du bassin montrant l'appareil de reproduction masculin [6].

1.2– Les testicules :

Ils sont situés dans les bourses, à la partie antérieure du périnée, sous la verge. Appendus au cordon spermatique, ils sont mobiles sous l'effet des fibres crémaster et de la pesanteur. Le testicule est ovoïde, lisse et brillant de couleur nacré. Sa consistance est ferme et régulière. Il mesure, en moyenne 4 à 5 cm de longueur, 2 à 3 cm de largeur, 2,5 cm d'épaisseur, et pèse en moyenne 20 g. Une couche de tissu fibreux dense constitue la capsule testiculaire appelée l'albuginée. Généralement, chez les sujets qui présentent une azoospermie sécrétoire, le testicule est de taille très diminuée, et la consistance est molle.

On lui décrit :

- 2 faces : une latérale convexe et l'autre médiane à peu près plane.
- 2 bords : un postéro-supérieur en rapport avec l'épididyme. L'autre est antéro-inférieur convexe et libre.
- 2 extrémités : une antéro-supérieure arrondie surmontée par la tête de l'épididyme. L'autre est postéro-inférieure donnant attache au ligament scrotal, qui la fixe au fond du scrotum.

1.3– Organes Génitaux annexes :

1.3.1– Les voies spermatiques

Les spermatozoïdes élaborés dans les tubes séminifères vont être évacués grâce à un système de canaux constituant les voies excrétoires du sperme. À ces conduits, sont annexés des glandes dont les produits de sécrétion participent à la constitution du sperme. On distingue 2 catégories de voies spermatiques : les voies spermatiques intra testiculaires et les voies spermatiques extra testiculaires.

1.3.1.1. Les voies spermatiques intra testiculaires (figure 2) :

a– Les tubes séminifères contournés :

Les lobules testiculaires, au nombre de 250 à 300, séparés par des cloisons fibreuses ; ils contiennent chacun 3 ou 4 canalicules séminifères contournés qui atteignent dans le testicule mature un diamètre de 140 à 300 μm et à l'état déroulé une longueur de 30 à 60 mm. C'est dans ces tubes que se forment les spermatozoïdes qui sont ensuite transportés dans les tubes séminifères droits.

b- Les tubes séminifères droits :

Ils ont une longueur de 1 mm. Ils relient les tubes séminifères à un réseau de canalicules appelé rete testis.

c- Le rete testis ou réseau de Haller :

C'est un réseau de canalicules contenu dans un épaissement de l'albuginée appelé le médiastinum testis. On leur attribue des fonctions d'échange contribuant à modifier la composition du fluide testiculaire.

Les spermatozoïdes, immatures et immobiles, traversent les voies spermatiques intra testiculaires, poussés par la pression du fluide testiculaire sécrété de façon continue par les cellules de Sertoli. Ce liquide serait remanié lors de son passage dans les tubes droits et le rete testis.

1.3.1.2. Les voies spermatiques extra-testiculaires (figure 2) :

a- Canalicules efférents :

Par l'intermédiaire du rete testis, les spermatozoïdes pénètrent dans une dizaine de canalicules efférents qui représentent la majeure partie de la tête de l'épididyme.

Chaque canalicule efférent a une longueur d'environ 20 cm mais il se tortille en un petit peloton conique de 2 cm dont le sommet commence à la pointe du rete testis et dont la base s'abouche dans le canal épидидymaire.

b- Epididyme (figure 2) :

C'est une formation en forme de virgule, longue d'environ 5 cm. il coiffe le testicule à la manière du "cimier d'un casque". On lui décrit trois parties d'avant en arrière :

- La tête : arrondie, lisse et volumineuse, elle est unie intimement au pôle antérieur du testicule
- Le corps
- La queue : unie au pôle postérieur du testicule, elle se prolonge, sans ligne nette de démarcation, par le canal déférent.

Sur le plan microscopique il comprend un épithélium régulier fait de cellules à stéréocils et de cellules basales qui reposent sur une membrane basale. Le canal épидидymaire n'est pas seulement une voie excrétrice du sperme, il joue un rôle déterminant dans la composition du fluide épидидymaire dans lequel les spermatozoïdes poursuivent leur maturation. Dans la partie initiale du canal, se fait la réabsorption de 90% du liquide séminal primitif. Les cellules de la tête et du corps épидидymaire synthétisent et sécrètent des protéines et des glycoprotéines, dont certaines se fixent sur la membrane plasmique des spermatozoïdes. Les cellules du corps concentrent en plus, à partir du sang, des molécules comme la carnitine. Quant aux cellules de la queue, elles synthétisent et sécrètent des lipides. Les cellules glandulaires épидидymaires ont donc un rôle important au cours du trajet épидидymaire. Elles sécrètent de nombreuses substances assurant la nutrition des spermatozoïdes, l'acquisition de leur mobilité et de leur pouvoir fécondant ; elles produisent en outre un facteur de décapacitation se fixant sur la membrane des spermatozoïdes pour empêcher l'expression prématurée de leur pouvoir fécondant.

Pendant le transit épидидymaire et en cas de séjour prolongé dans la queue de l'épididyme, de nombreux spermatozoïdes dégènèrent. Les cellules épидидymaires aidées de macrophages (spermiophages) assurent la digestion des spermatozoïdes vieillissants et dégénérés.

c- le canal déférent :

Il s'étend depuis la queue de l'épididyme jusqu'à la base de la prostate. Il chemine sur la face médiale du testicule puis traverse successivement la racine des bourses, la région inguinale, la fosse iliaque et la cavité pelvienne.

Sa longueur est de 35 à 45 cm, diamètre externe de 2 à 3 mm, sa paroi très épaisse lui confère une résistance particulière qui permet de le palper facilement car : il se déroule sous les doigts.

Le canal déférent se dilate à son extrémité distale pour constituer l'ampoule du déférent. La structure de cette ampoule est comparable à celle des vésicules séminales. Elle s'ouvre dans sa partie basse et marque le passage du canal déférent au canal éjaculateur. L'ampoule du canal déférent elle apparaît comme un réservoir à l'intérieur duquel s'accumule le sperme dans l'intervalle des éjaculations.

Les anomalies du canal déférent peuvent être à l'origine d'une infertilité masculine de type excrétoire. Pour ces anomalies, il y a celles qui sont congénitales (atrésie) et acquises (post-infectieuse).

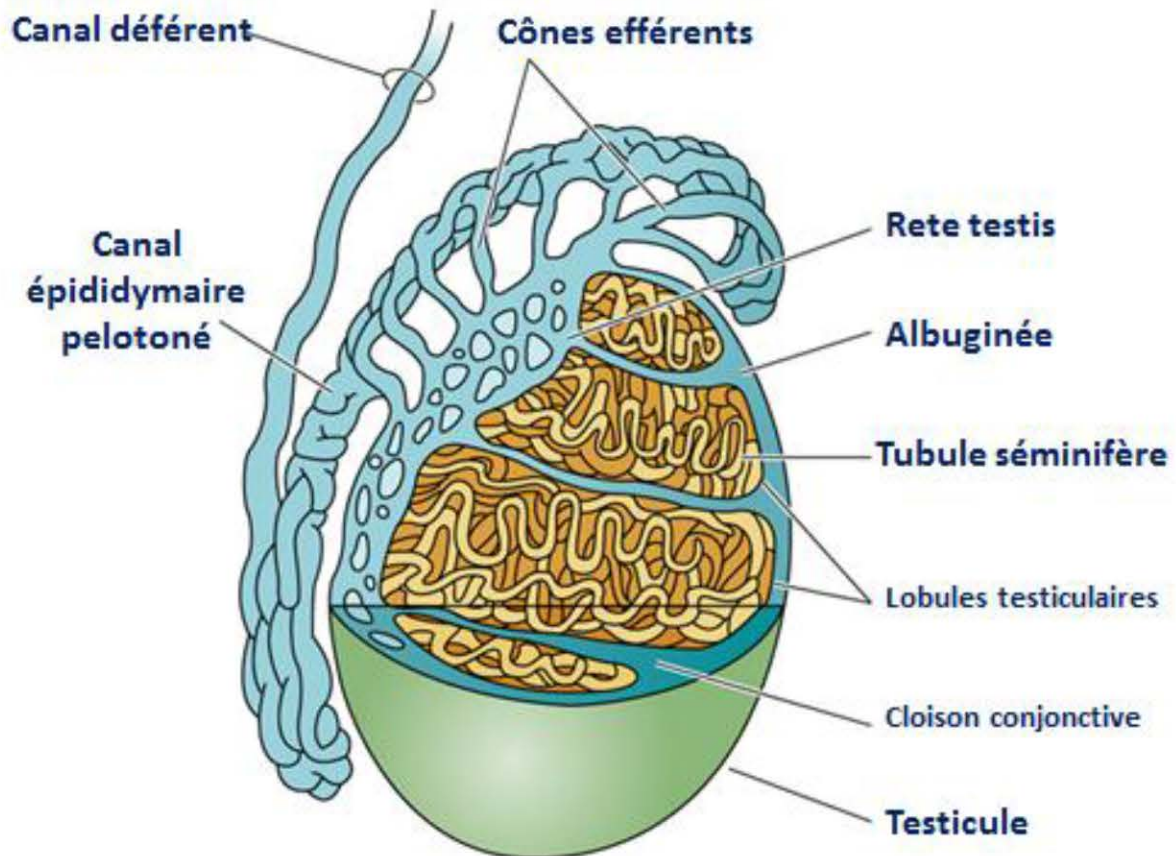


Figure 2 : Représentation schématique du testicule, des voies génitales intra-testiculaires et des voies génitales extra-testiculaires proximales [6].

d- Le Canal éjaculateur :

Le canal éjaculateur est un simple conduit vecteur formé par l'union de la vésicule séminale et du conduit déférent correspondant, est situé dans la quasi-totalité dans l'épaisseur de la prostate. Il s'abouche dans l'urètre au niveau d'une zone bombée : Le veru montanum long de 2 cm sur 1 mm de diamètre, son calibre diminue progressivement de son origine à sa terminaison.

1.3.2- Les glandes annexes (Figure 3) :

Ces glandes produisent la majeure partie du sperme. Cette sécrétion est androgéno-dépendante.

a- Les vésicules séminales :

Chacune des 2 vésicules séminales est branchée sur l'extrémité terminale de l'un des canaux déférents et s'étend en dehors de lui, entre la vessie et le rectum, suivant une direction oblique en dehors, en arrière et un peu en haut. Elles sont longues de 6 centimètres en moyenne. Les vésicules séminales sécrètent un liquide clair, visqueux et alcalin, qui agit sur l'état physiologique des spermatozoïdes en maintenant normale leur mobilité et en leur assurant une vitalité maximale dans le sperme.

Extérieurement, les vésicules séminales apparaissent bosselées sur toute leur surface. Leur diamètre augmente depuis leur origine sur le canal déférent, jusqu'à leur extrémité supéro-externe.

Le col de la vésicule est enfin dans la base de la prostate. Il s'unit avec la terminaison du déférent à angle très aigu.

Les vésicules séminales sécrètent plus de la moitié du liquide séminal, environ 60%, (le reste provenant essentiellement de la prostate) ce liquide jaunâtre, visqueux et alcalin, est riche en fructose, vitamine C, protéines et prostaglandines ; le fructose joue un rôle important dans la nutrition et la mobilité des spermatozoïdes [5].

b- La prostate :

C'est un organe musculo-glandulaire impair et médian. Elle est située entre le fond de la vessie et le muscle transverse profond du périnée en arrière de la symphyse pubienne et en avant du rectum à partir duquel elle peut être palpée. Elle mesure en moyenne 3 cm de haut, 4 cm de large et 2 cm de profondeur chez un adulte jeune et pèse alors 20 à 25 grammes. La prostate est perforée par l'urètre et par les deux canaux éjaculateurs. Elle possède deux sphincters :

- Un sphincter interne formé de fibres musculaires lisses (sphincter lisse) entoure la partie supérieure de l'urètre. La tonicité de ce sphincter empêche l'écoulement l'éjaculation rétrograde.
- Un sphincter externe, formé de fibres musculaires striées comprend un anneau à la partie inférieure de l'urètre prostatique, et une extension en forme de bouclier sur les faces antérieure et antérolatérales de la prostate. Le sphincter externe est responsable de la continence urinaire.

Les glandes prostatiques secrètent un liquide épais, blanchâtre qui représente environ 30 % du volume total d'un éjaculat. Il est légèrement acide (pH : 6,5) en raison de la présence de citrate à de fortes concentrations. On y retrouve également La PSA, La phosphatase acide prostatique et le zinc.

c- Les glandes de COWPER (figure 3) :

Il s'agit de 2 petites masses glandulaires de la taille de petites noisettes situées à la jonction de l'urètre spongieux dans l'épaisseur de l'aponévrose pénienne moyenne.

Elles possèdent un canal excréteur relativement long chez l'homme adulte, qui atteint 30 à 40 mm de long et il s'ouvre sur la paroi postérieure de l'urètre pénien. Elles sécrètent un liquide mucoïde qu'elles déversent dans la région postérieure de l'urètre membraneux. Ce liquide participe à la lubrification de l'urètre. Lors de l'éjaculation, il est excrété en plus grande quantité et précède l'arrivée du sperme.

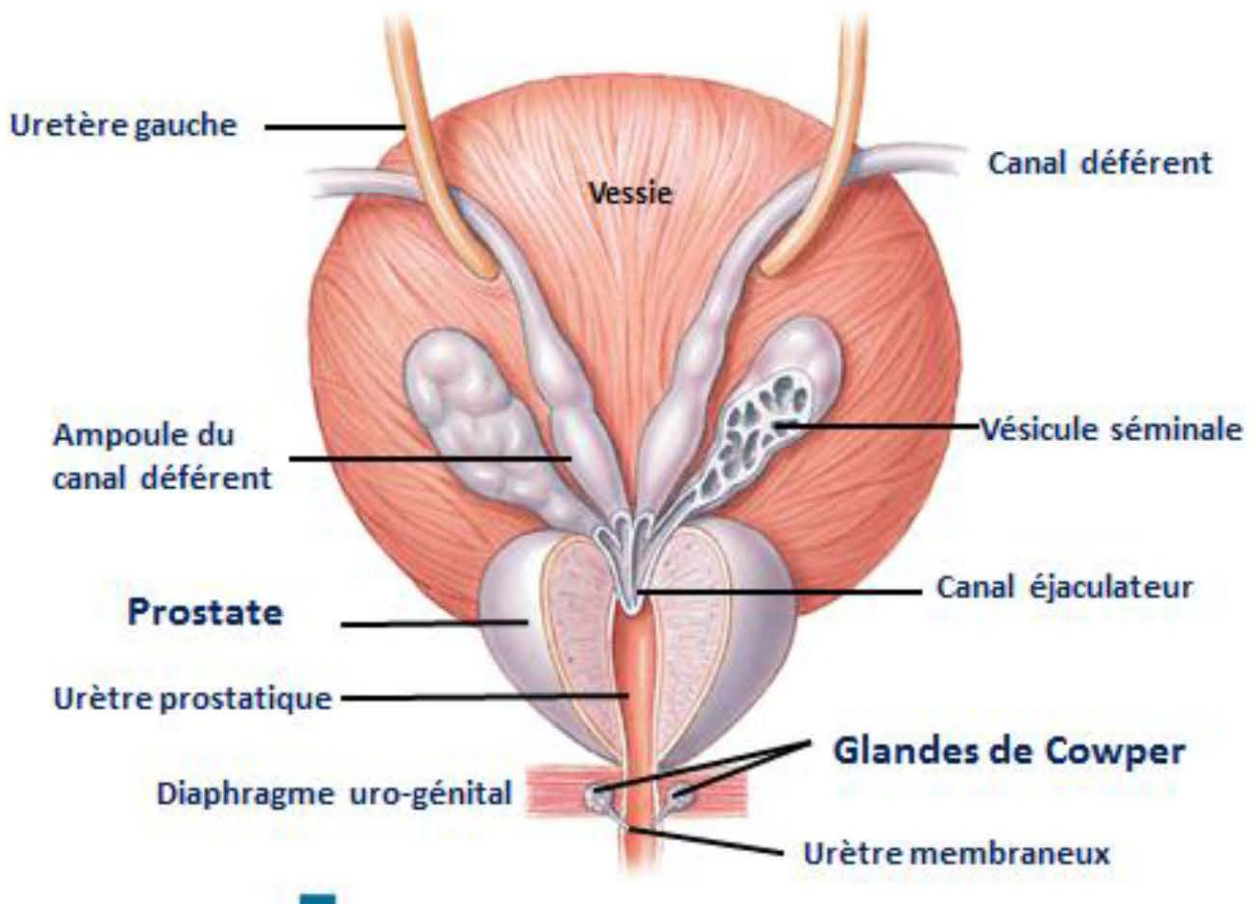


Figure 3 : représentation schématique d'une vue postérieure de la vessie montrant les voies génitales et les glandes annexes masculines [6].

1.4- Organes génitaux externes (Figure 4)

a- La verge :

C'est l'organe de la copulation destiné à déposer le sperme dans les voies génitales de la femme. Il comprend une racine fixe et un corps mobile, se terminant par une extrémité renflée appelée gland. La peau du pénis est lâche et glisse vers l'extrémité distale pour former le prépuce autour du gland.

La verge renferme la partie spongieuse de l'urètre et trois parties cylindriques de tissu érectile. Un corps érectile médian appelé corps spongieux entourant l'urètre et s'étendant vers l'extrémité distale de pénis pour former le gland, et 2 corps érectiles dorsaux appelés Corps Caverneux, constituant la plus grande partie du pénis.

Au moment de l'éjaculation, l'ensemble du liquide séminal, comprenant les spermatozoïdes et les sécrétions des vésicules séminales et prostatiques est conduit vers l'urètre prostatique après passage dans les canaux éjaculateurs. La fermeture concomitante du sphincter vésical associé à un péristaltisme des muscles lisses assure l'expulsion du liquide séminal vers l'urètre pénien puis à travers l'orifice du méat urétral. Tout ce cheminement peut être le siège d'obstacles.

b- Le scrotum :

C'est un sac de peau et de fascia superficiel suspendu à l'extérieur de la cavité abdomino-pelvienne qui contribue au maintien d'une température scrotale relativement stable de 32 à 35°C, essentielle à la spermatogénèse (figure 4).

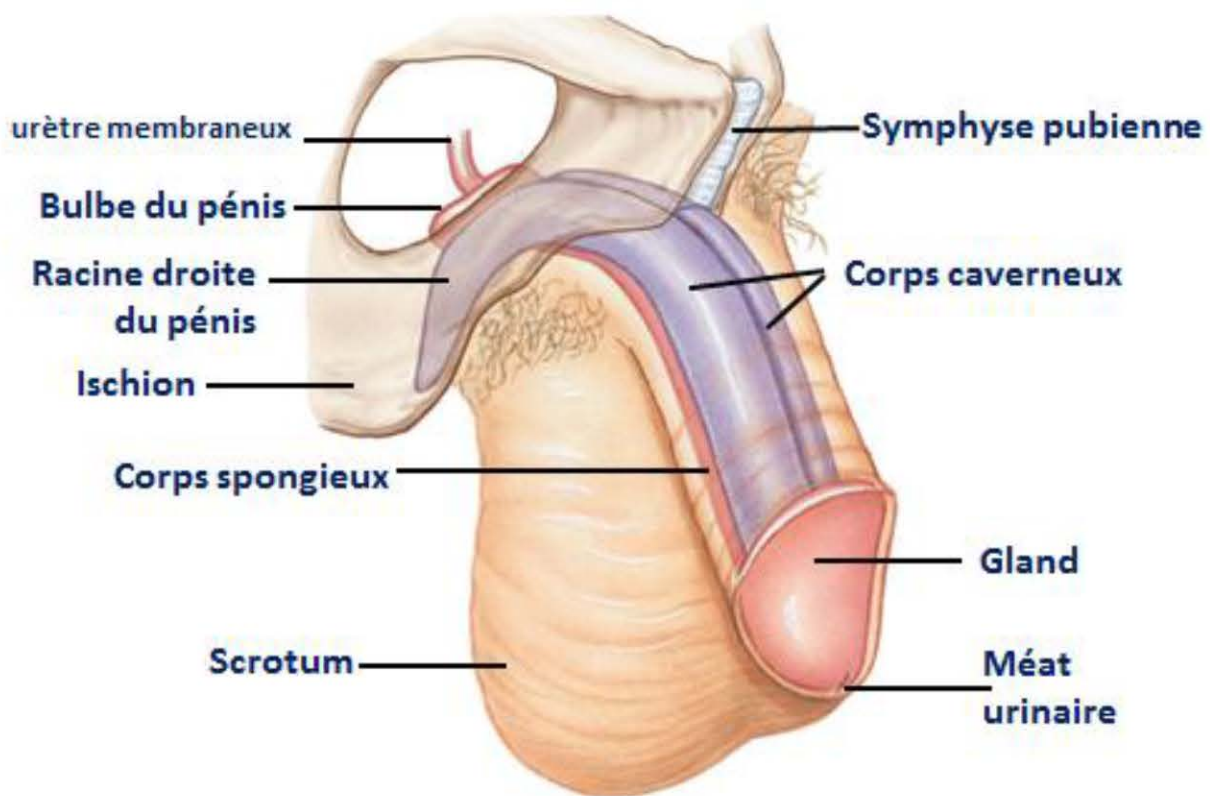


Figure 4 : Vue antérolatérale du pénis montrant la position des tissus érectiles [6].

2– Embryologie de l'appareil génital masculin [7]

a– Facteurs de détermination du sexe

Le sexe du fœtus est déterminé au cours du premier trimestre par des facteurs génétiques et hormonaux. Le génotype est responsable de l'apparition des caractères sexuels primaires que sont les testicules. Cette détermination du sexe dépend du chromosome Y via le facteur de déterminisme testiculaire TDF (Testis Determining Factor) contenant le gène *SRY*. Il provoque l'induction de la différenciation masculine des cellules des cordons sexuels de la gonade en cellules de Sertoli (figure 5).

La différenciation sexuelle se fait par étapes successives avec, selon leur chronologie d'apparition, la formation de gonades puis celle des voies génitales et enfin, la mise en place des organes génitaux externes.

A partir de la 7^{ème} semaine le développement embryonnaire, l'Hormone Anti-Müllerienne (AMH), sécrétée par les cellules de sertoli, induit la régression des canaux de Müller (faisant partie intégrante de l'appareil sexuel féminin). Dès la 8^{ème} semaine de développement commence la sécrétion par les cellules de Leydig, de testostérone responsable de la différenciation sexuelle du tractus génital interne, du sinus uro-génital et des organes génitaux externes. La différenciation du tractus génital male est beaucoup plus dépendante de la production d'hormones que celui de la femme.

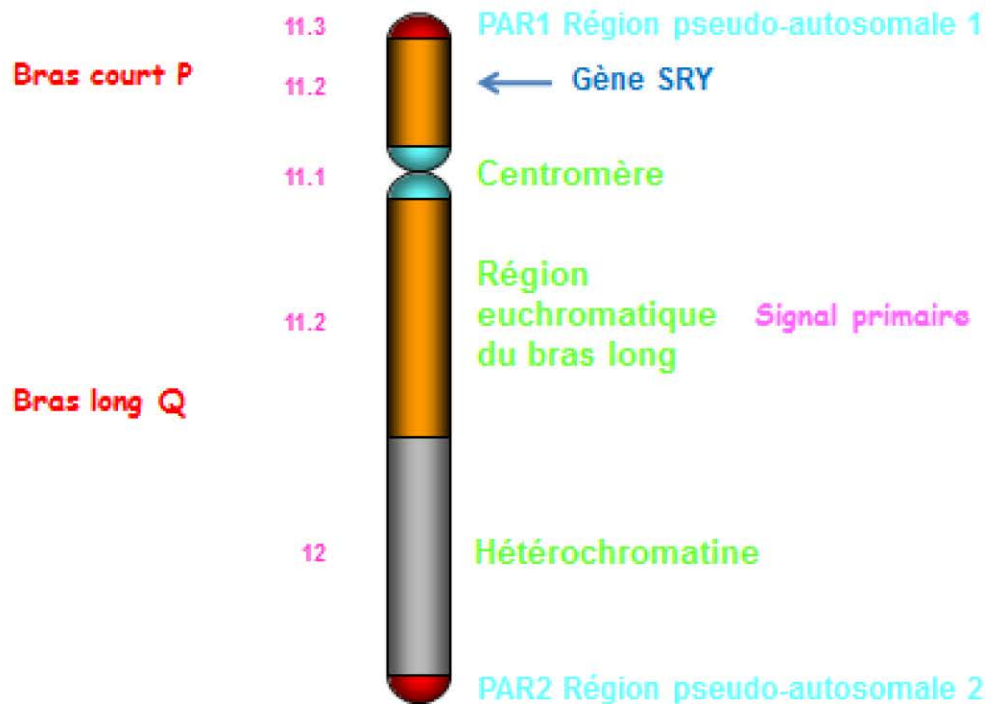


Figure 5 : Représentation schématique du chromosome Y [aimablement fournie par Pr Mohammed SEKAL].

b- Formation des gonades chez le fœtus

La formation de gonades résulte de l'interaction entre les cellules germinales primordiales et les crêtes génitales. Ces dernières, d'origine mésoblastique, donneront les cellules de Sertoli. Les cellules germinales primordiales sont l'origine des spermatozoïdes. Elles proviennent de la différenciation de l'épiblaste à la 2^{ème} semaine et sont donc, comme toutes les cellules du corps, diploïdes. À la 3^{ème} semaine, elles vont migrer par des mouvements amiboïdes jusque dans la splanchnopleure de la paroi de la vésicule vitelline secondaire et se disposer à proximité de l'allantoïde naissant. Puis, entre la 4^{ème} et la 6^{ème} semaine les cellules germinales primordiales vont à nouveau migrer, pour coloniser les crêtes génitales. Les cellules germinales primordiales se multiplient tout au long de la migration. A ce stade, l'embryon n'a pas encore de sexe (figure 6).

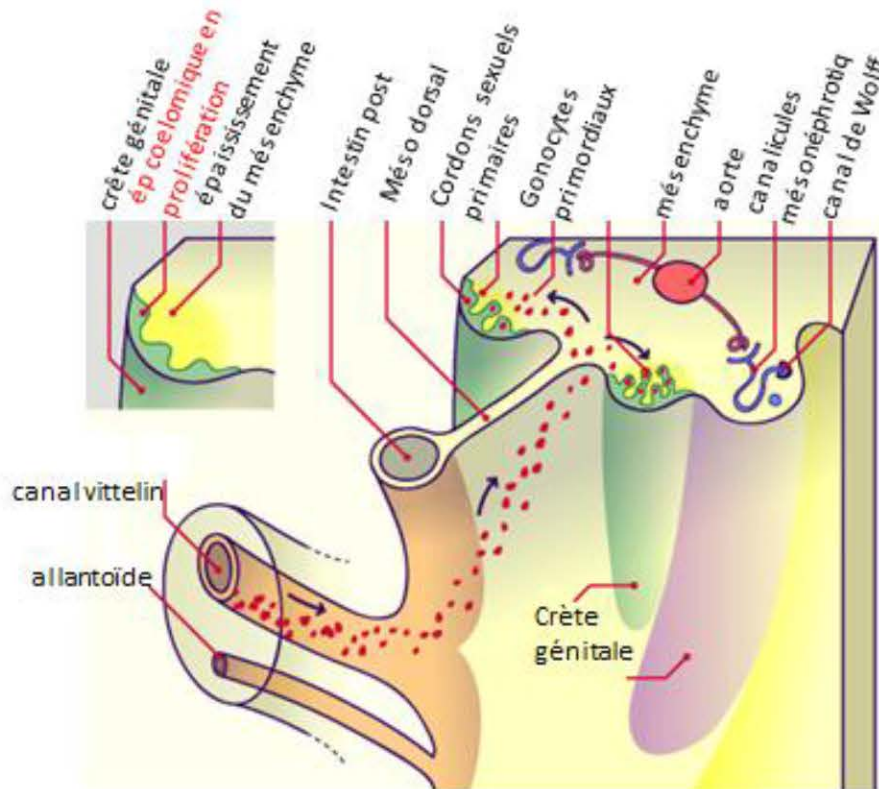
A la 7^{ème} semaine, la différenciation sexuelle masculine commence avec l'expression du gène *SRY* (figure 6). Les cellules des crêtes génitales devenues les cordons primitifs, vont devenir les cellules de Sertoli qui formeront les futurs tubes séminifères à la puberté, eux même en contact avec le canal de Wolff qui va devenir le canal épидидymaire.

La gamétogenèse va commencer avec l'apparition des premiers gamètes. Leur cycle va rester bloqué avant une entrée en deuxième division de méiose, qui se terminera à la puberté. Puis l'hormone anti-müllérienne, produite par les cellules de Sertoli, va faire régresser les canaux de Muller (organes génitaux de type féminin) et ainsi permettre la différenciation des cellules de Leydig.

La testostérone va être sécrétée pendant la vie intra-utérine, d'abord sous l'effet de l'hormone HCG placentaire, puis à la naissance sous l'effet de l'hormone LH du nouveau-né. Ensuite, elle s'arrête 6 mois après à la naissance pour ne reprendre qu'à la puberté déclenchant la formation de spermatozoïdes.

Les testicules descendent progressivement dans leur loge définitive que sont les bourses entre le 3^{ème} mois et la fin de la grossesse. Ce processus est régulé par les androgènes et par l'insuline Like protéine 3 (INSL3) sécrétée elle aussi par les cellules de Leydig.

A :



B :

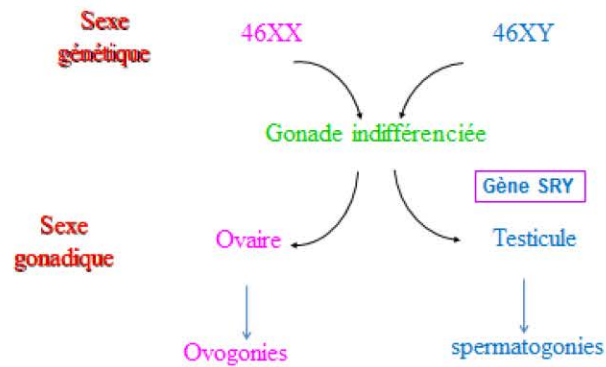


Figure 6 : La différenciation gonadique

A : migration des gonocytes primordiaux vers les crêtes génitales [8].

B : déterminisme de la différenciation gonadique selon le sexe [aimablement fournie par Pr Mohammed SEKAL].

c- Apparition des voies génitales

Lors du stade embryonnaire indifférencié, il y a formation des canaux de Wolff et de Müller (figure 7). La différenciation sexuelle dans le sens masculin va avoir lieu avec la régression des canaux de Muller sous l'action de l'AMH et le développement ainsi que la différenciation des canaux de Wolff dès la 8^{ème} semaine sous l'action de la testostérone produite par les cellules de Leidig.

La partie proximale du canal de Wolff va former l'épididyme, avec sur la partie supérieure (tête de l'épididyme), les projections des canalicules efférents. La partie inférieure du canal de wolff forme la queue de l'épididyme et le canal déférent. Il s'agit d'un canal musculo-épithélial servant à la propulsion du sperme pendant l'éjaculation.

d- La différenciation des organes génitaux externes

Cette différenciation se fait dans le sexe masculin grâce aux androgènes. Jusqu'à la fin de la 8^{ème} semaine, le fœtus n'a toujours pas de sexe phénotypique. Puis, sous l'action de la testostérone et surtout de la dihydrotestosterone (DHT), son analogue plus puissant, la différenciation s'initie. Le tubercule génital s'allonge et donne le pénis, les replis génitaux fusionnent et forment l'urètre, les bourrelets génitaux se soudent et donnent le scrotum, où se logeront les testicules.

L'extrémité du gland va se creuser en son centre pour former l'urètre balanique et en périphérie, il y aura formation d'un prépuce.

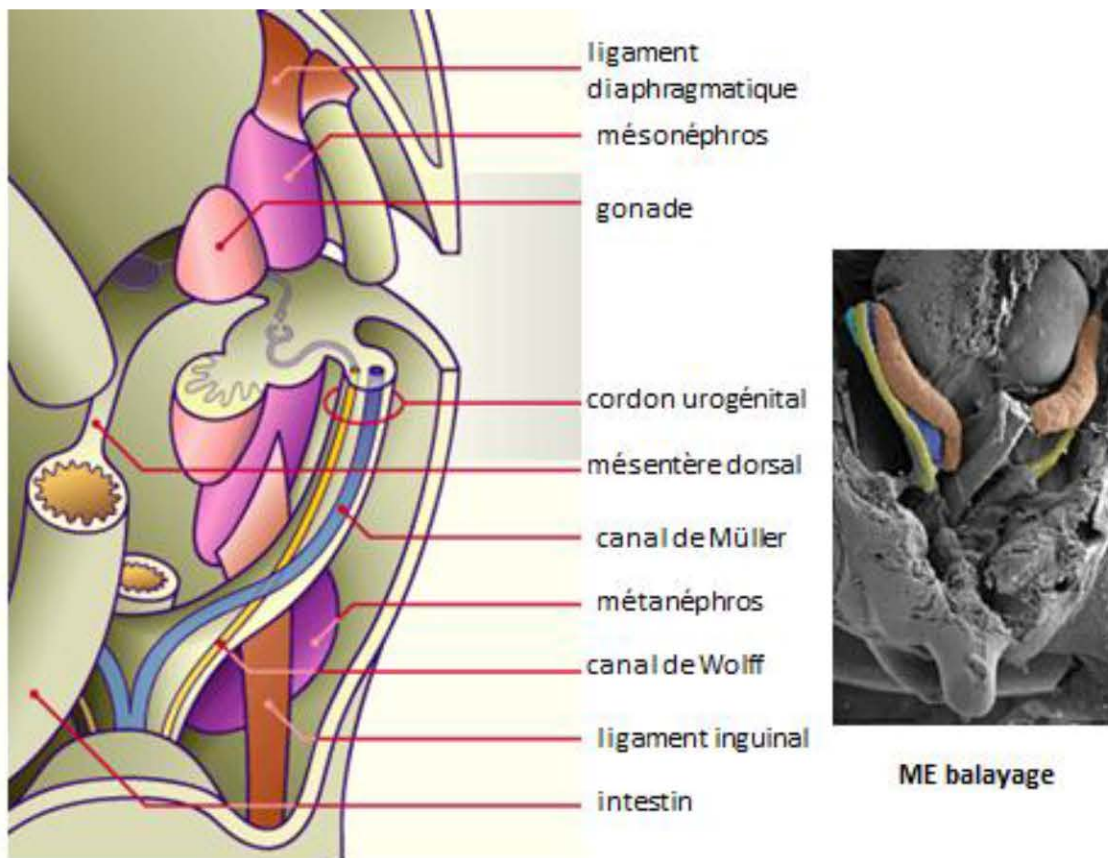


Figure 7 : à gauche, représentation schématique des voies génitales internes à la 6^{ème} semaine du développement embryonnaire. A droite, vue en microscopie électronique à balayage [8].

3– Histologie fonctionnelle et régulation de l'appareil de reproduction

3.1– Histologie fonctionnelle des testicules :

3.1.1– Les tubes séminifères (figure 8) :

Les tubes séminifères sont le lieu de la spermatogénèse. La paroi de chaque tube est constituée par l'épithélium séminifère, où sont associées les cellules de Sertoli et les cellules de la lignée germinale, entourés d'une enveloppe péri-tubulaire.

3.1.1.1 L'enveloppe péri tubulaire :

L'enveloppe péri-tubulaire est composée d'une lame basale et de trois ou quatre couches concentriques de cellules péri-tubulaires séparées par du matériel fibrillaire et collagène. Les cellules péri-tubulaires, contractiles, participent à la progression du contenu luminal vers les voies excrétrices. Sous l'action de la testostérone, les cellules péri-tubulaires sécrètent des facteurs paracrines régulant l'activité des cellules de Sertoli (P-mod S). Les altérations de cette enveloppe sont souvent associées aux atteintes de la spermatogénèse

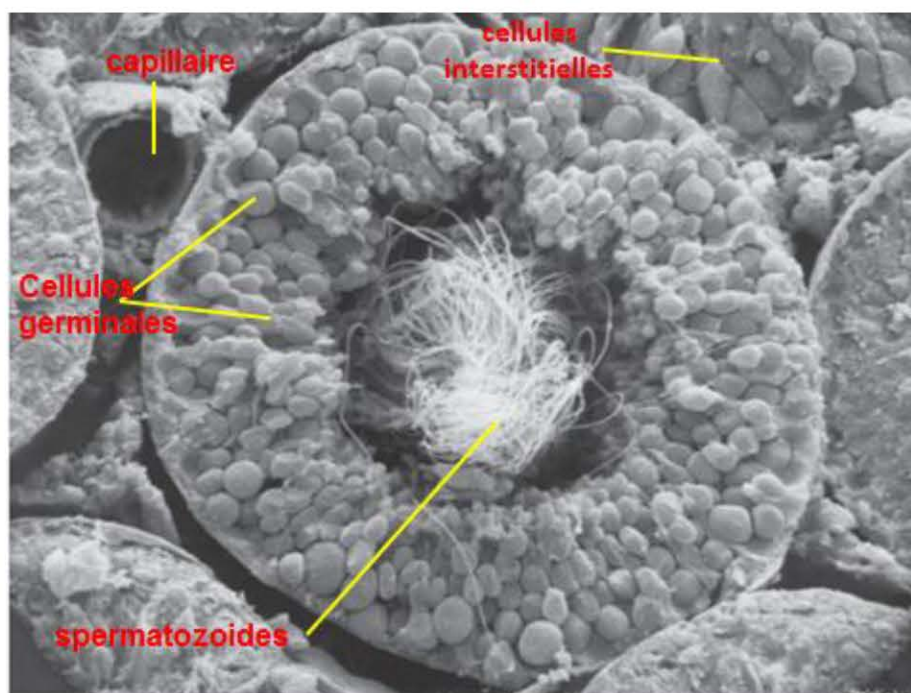
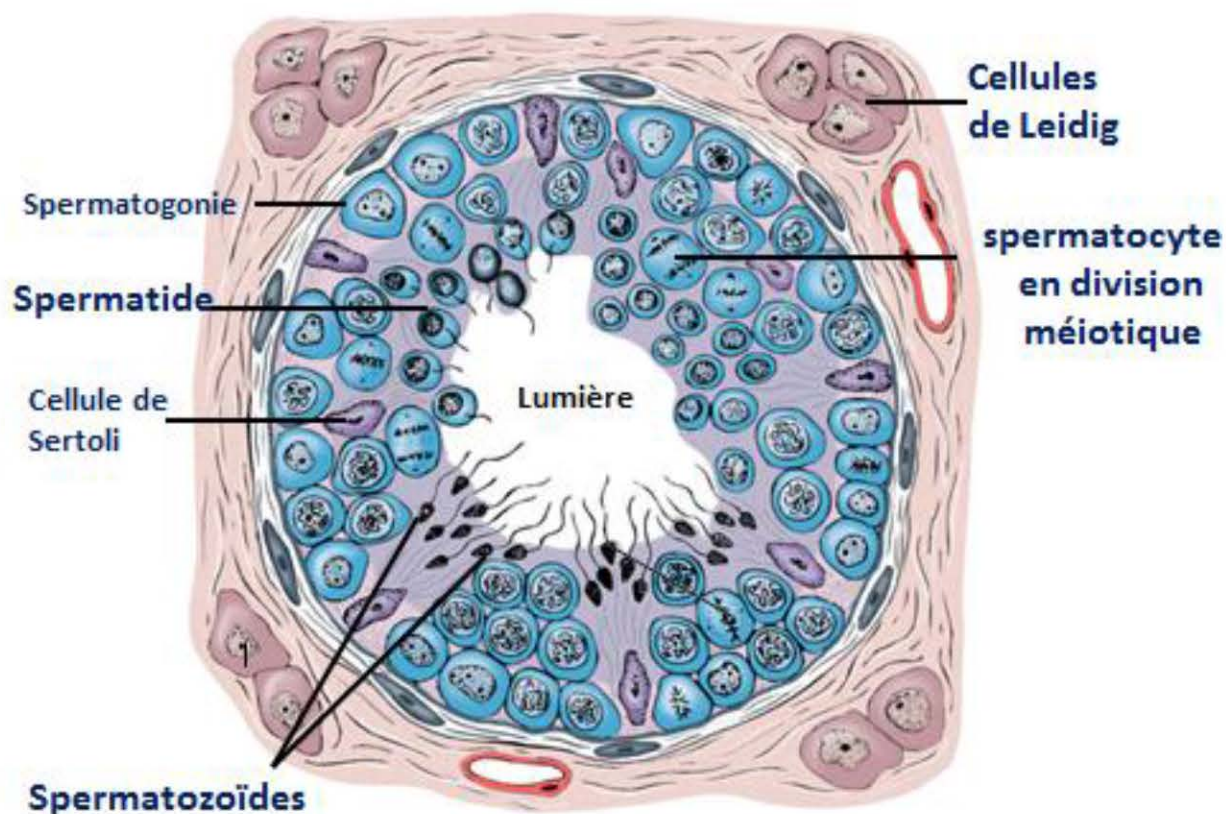


Figure 8 : En haut : Représentation schématique de la composition des tubules séminifères et de l'espace interstitiel testiculaire. En bas : vue en microscopie électronique à balayage [6].

3.1.1.2 Les cellules de Sertoli [9] :

Ce sont des cellules fixes qui occupent toute la hauteur de l'épithélium séminifère (70 micromètre) et envoient des expansions autour des cellules germinales. Les cellules de Sertoli ont un rôle important pour la bonne marche de spermatogénèse :

a- Rôle structural (figure 9) :

Par les jonctions étanches qu'elles établissent entre elles vers leur pôle basal elles constituent une barrière physique séparant le compartiment basal renfermant les spermatogonies et les spermatocytes I préléptotènes en rapport avec l'interstitium contenant les capillaires sanguins et les cellules de Leidig et le compartiment adluminal, elles forment ainsi la barrière hémato-testiculaire. Du côté apical, les spermatocytes II, les spermatides et les spermatozoïdes baignent dans un environnement constitué d'éléments synthétisés et transportés par les cellules de Sertoli. Il en va de même pour le fluide testiculaire dont la constitution est entièrement contrôlée par les cellules de Sertoli.

Le principal effet de la barrière sang-testicule est d'empêcher la reconnaissance de sites antigéniques exprimés sur les éléments de la lignée germinale à partir des stades méiotiques, par les cellules du système immunitaire maintenues en deçà du dispositif de jonctions serrées. Toute rupture importante de cette barrière, traumatique, post infectieuse, post biopsique, est à l'origine d'un processus d'auto-immunisation pouvant évoluer dans les cas sévères vers une azoospermie [9].

b- Rôle dans la progression des cellules germinales :

Elles exercent des fonctions mécaniques, par leur cytosquelette associé à des protéines contractiles, elles permettent aux cellules germinales de migrer au fur et à mesure de leur maturation, en direction de la lumière du tube séminifère.

c- Rôle trophique :

Elles exercent aussi des fonctions trophiques en assurant la maturation de la lignée germinale. Elle assure une fonction paracrine à l'égard des cellules germinales et elles sont responsables de la production du plasma séminal primitif.

d- Rôles sécrétoires :

Les cellules de Sertoli ont une activité de sécrétion importante notamment pour le soutien et la maturation des cellules germinales. Parmi les protéines qui sont sécrétées on retrouve des protéases, des anti-protéases, des hormones, des substrats énergétiques, des facteurs de croissance, des facteurs autocrines et paracrines et des composants de la matrice extracellulaire.

L'Androgen Binding Protein (ABP) : permet le transport de la testostérone depuis la partie basale vers les cellules germinales. La fixation et le transport de la testostérone dans les cellules de Sertoli et les cellules germinales. Ce mécanisme de transport actif permettrait d'atteindre des concentrations intracytoplasmiques d'androgènes bien supérieures à celles que fournirait un mécanisme de diffusion passive. L'ABP présente une très grande homologie avec la SHBG (Sex hormone binding globulin), synthétisée par les hépatocytes, qui lie et transporte les stéroïdes dans le plasma. L'ABP est présente essentiellement au niveau du testicule et de la tête de l'épididyme, cependant elle est également exprimée dans le cerveau dans les deux sexes [10].

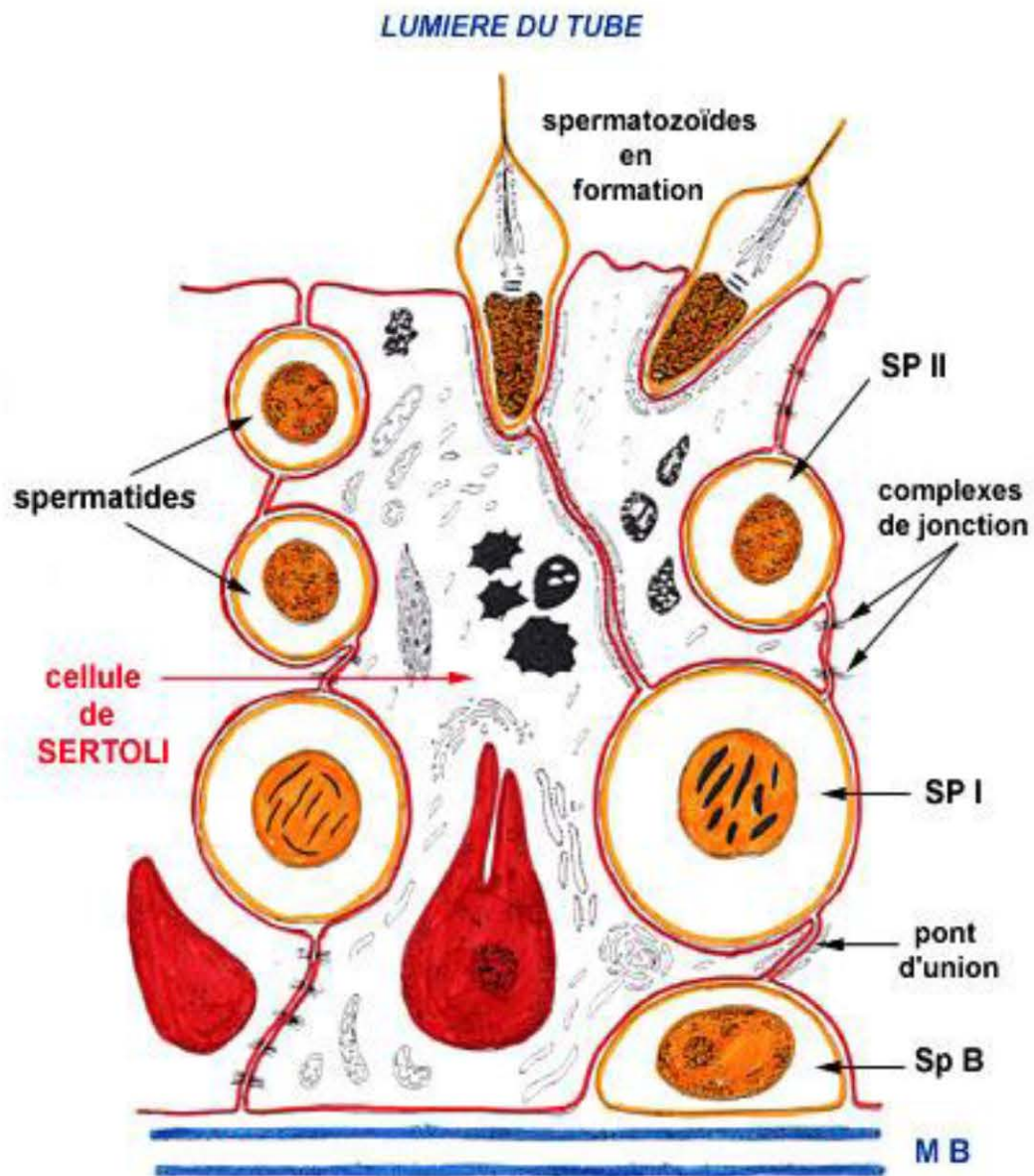


Figure 9 : Représentation schématique de la cellule de Sertoli et de ses rapports avec la lignée germinale [9].

L'inhibine et l'activine :

L'inhibine est constituée de 2 sous-unités α et β . L'activine est un homodimère de 2 sous-unités β . Il existe une grande homologie de structure entre ces deux glycoprotéines et les facteurs de croissance de la famille du TGF β , impliqués dans la régulation de la prolifération et différenciation cellulaire. Dans le testicule, l'inhibine et l'activine sont principalement produites par les cellules de Sertoli. La sécrétion d'inhibine par la cellule de Sertoli est directement influencée par la FSH qui stimule la production de la sous-unité α sans modifier celle de la sous-unité β . L'inhibine inhibe la synthèse et la libération de FSH par les cellules hypophysaires. À côté de leur action hormonale sur la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires, l'inhibine et l'activine sont des facteurs paracrines, intervenant au cours du développement embryonnaire du testicule et dans la régulation des fonctions testiculaires. Elles sont respectivement responsables de l'activation et l'inhibition de la stéroïdogénèse.

L'AMH ou müllerian inhibiting substance [11].

C'est une glycoprotéine, dont la structure la rattache à la famille des facteurs de croissance, en particulier du TGF β . L'AMH est un dimère stabilisé par des ponts disulfures. Elle est produite par les cellules de Sertoli immatures chez le fœtus masculin sous contrôle du gène **SRY**. Elle est maximale à la 8^{ème} semaine, progressivement décroissante pendant la gestation, chez l'enfant et à la puberté, avec une variation inversement proportionnelle entre testostérone et AMH. Une anomalie du gène de l'AMH ou de son récepteur peut à l'origine du syndrome de persistance des canaux de Müller ou syndrome de « l'homme à utérus ».

3.1.1.3 La spermatogénèse : [12]

La spermatogénèse est le processus par lequel les cellules germinales se différencient afin de donner les spermatozoïdes. Ainsi, des cellules germinales

diploïdes ($2n$ chromosomes), les spermatogonies souches, génèrent des gamètes masculins haploïdes (n chromosomes), les spermatozoïdes. Entre la puberté et la sénescence. La spermatogenèse a une durée fixe de 74 jours dans l'espèce humaine. Dans une région déterminée de la paroi d'un tube séminifère, le départ d'une nouvelle lignée à partir d'une spermatogonie est déclenché tous les 16 jours, périodicité qui constitue le cycle de l'épithélium séminifère. Les spermatogonies souches (de renouvellement), entrent en spermatogenèse en groupe et non individuellement et restent reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques, qui mettent en contact direct les cytoplasmes de ces cellules et jouent un rôle dans la synchronisation du développement de groupes isogéniques des cellules germinales (figure 10).

D'un point de vue fonctionnel, la spermatogenèse peut être scindée en 3 phases successives impliquant des types de cellules germinales différents (figure 10).

a- **La phase proliférative :**

Elle consiste en des mitoses des spermatogonies de type A permettant le maintien et le renouvellement de l'épithélium séminifère [12]. Au départ, une spermatogonie indifférenciée et isolée de type Ad appartenant au stock de cellules germinales souches se divise de manière asymétrique en 2 cellules filles : une spermatogonie de type Ad qui permet le maintien du pool de spermatogonies souches et une spermatogonie de type appariée Ap. Cette dernière se divise en 2 spermatogonies de type B. Une mitose finale des spermatogonies de type B permet de donner naissance aux spermatocytes I dits pré-leptotènes.

b- La phase méiotique :

La méiose est constituée d'une succession de 2 divisions cellulaires consécutives. La 1^{ère} division méiotique réductionnelle comporte une prophase I longue (se subdivisant en 5 stades : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse), la métaphase I, l'anaphase I et la télophase I. Au cours de la prophase I a lieu le crossing-over qui assure le brassage génétique et ainsi une diversité génétique des gamètes. De cette manière, les spermatocytes I donnent des spermatocytes II.

Ces spermatocytes II subissent la seconde division méiotique équationnelle où les chromatides sœurs se répartissent entre les 2 cellules filles pour donner les spermatides rondes. Chez l'homme, le nombre de spermatides produits par chaque spermatocyte I ne correspond pas au rendement maximal de quatre pour un. En effet, 25% des cellules germinales dégénèrent entre le stade spermatocyte et le stade spermatide.

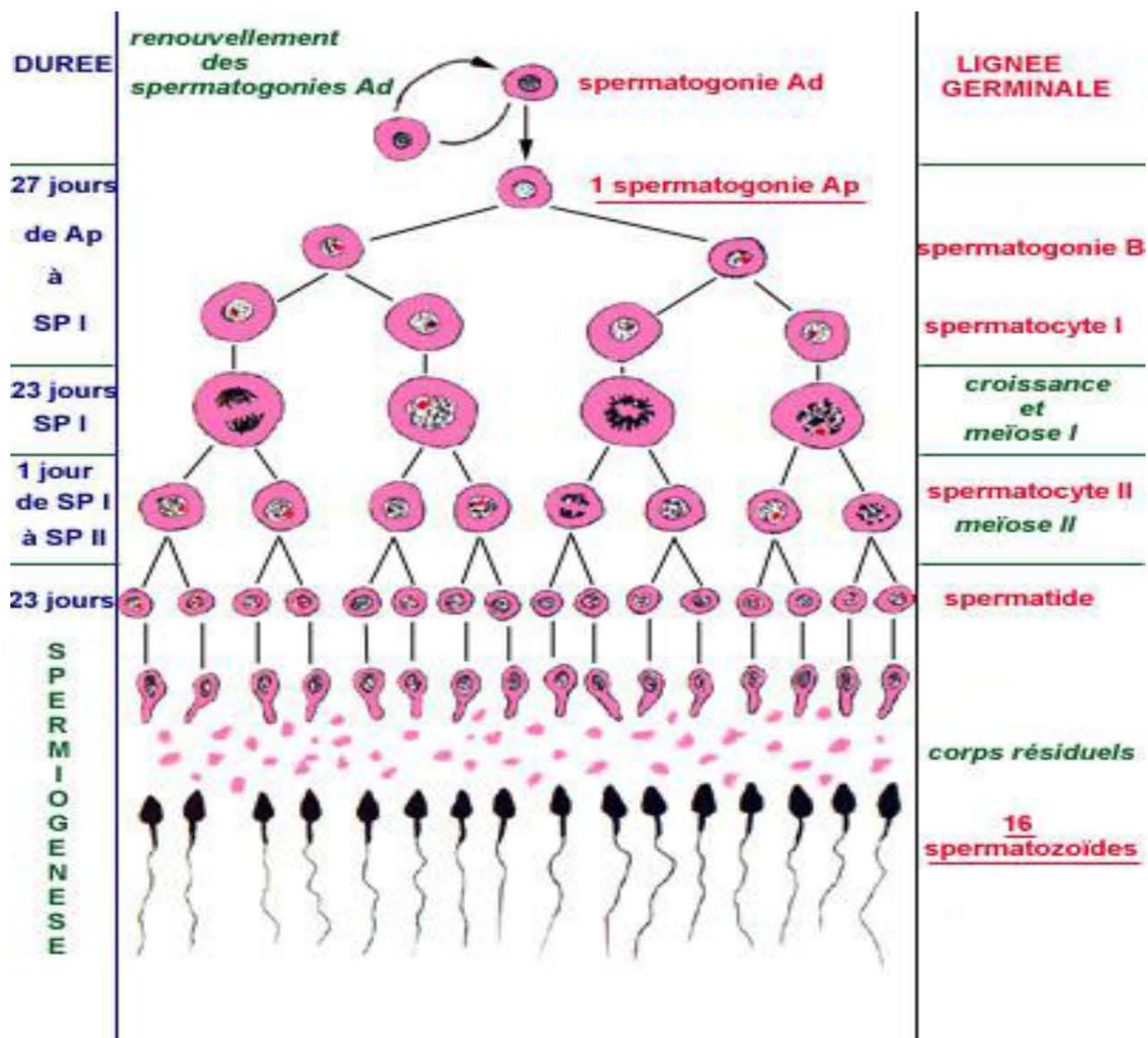


Figure 10 : Evènements, durée et produit de la spermatogénèse [12].

c- La spermiogénèse (figure 11) :

Au cours de cette phase les spermatides rondes immatures se différencient en spermatozoïdes. Lors de leur différenciation en spermatozoïde, les spermatides subissent plusieurs modifications et changements morphologiques. Tout d'abord, leur noyau se condense et se place en position sous-membranaire. On assiste également au remplacement des histones par des protéines nucléaires plus basiques, les protamines. L'acrosome se forme par le rassemblement des vésicules de l'appareil de Golgi, il contiendra notamment les enzymes protéolytiques nécessaires lors de la fécondation. Au niveau de la partie proximale, les mitochondries s'assemblent en spirale au niveau de la pièce intermédiaire. Le flagelle se développe à partir du centriole distal. Des microtubules se développent en arrière de l'acrosome et les corps résiduels (fragments de cytoplasme non utilisés) seront éliminés par la cellule puis phagocytés par les cellules sertoliennes.

Au cours de la spermiogénèse (la tête des spermatides fait face au compartiment basal des tubes séminifères et la dernière étape consiste en la translocation des spermatozoïdes de la partie adluminale du tube séminifère vers la lumière du tube. Cette phase de libération des spermatozoïdes matures, où ils se détachent de la cellule de Sertoli dans la lumière du tube séminifère, est appelée spermiation.

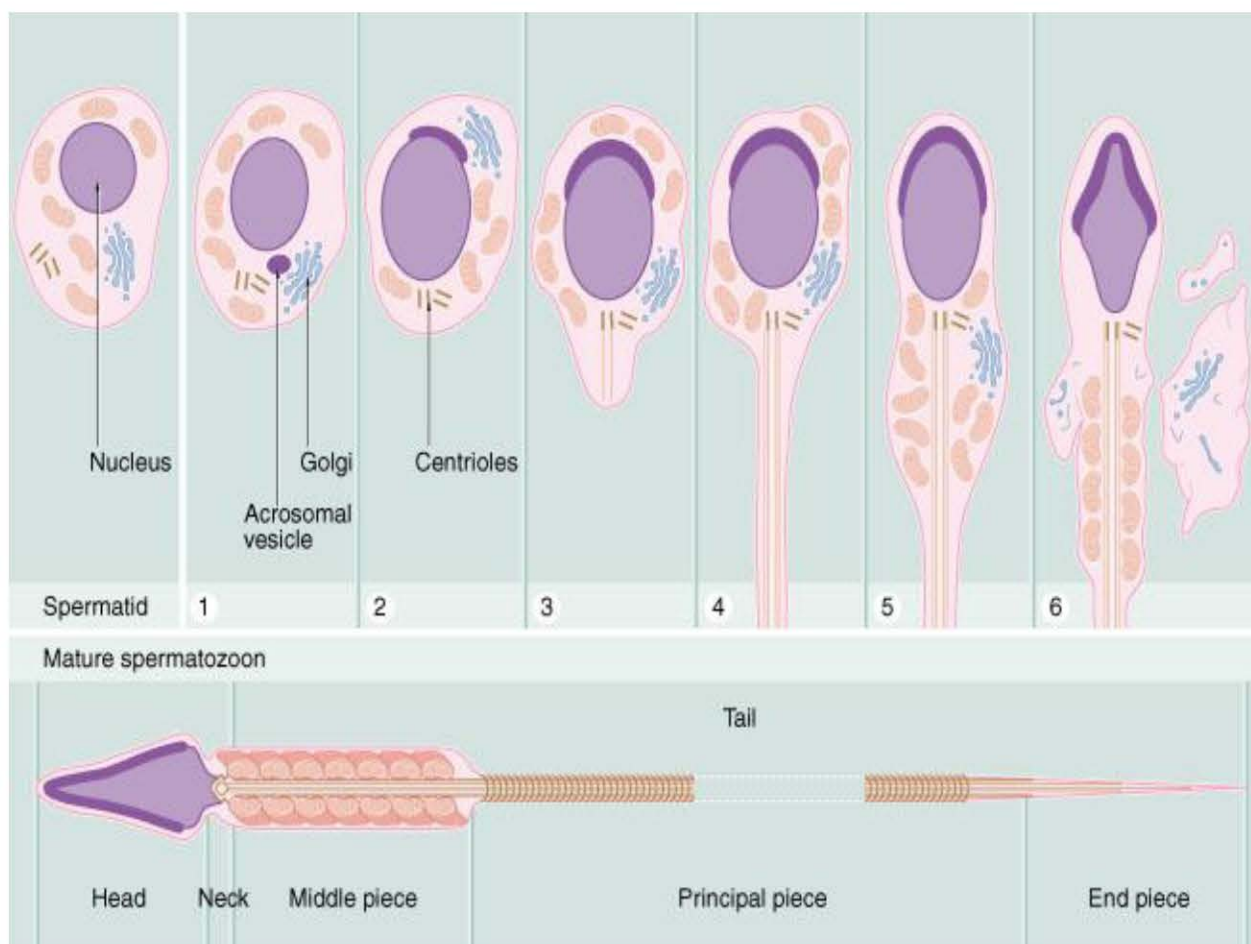


Figure 11 : Modifications des spermatides au cours de la spermiogénèse et aspect général du spermatozoïde [6].

d- Le spermatozoïde

Il mesure 50 à 60 μm de longueur et il est constitué de la tête et du flagelle. La tête est ovale et de contour régulier. Elle comprend le noyau, qui renferme le matériel génétique condensé sous forme de chromatine, et l'acrosome, qui occupe entre 40 et 70 % de la tête. L'acrosome est chargé d'enzymes hydrolytiques capables de percer la zone pellucide de l'ovocyte lors de la fécondation. Le flagelle est mince, non enroulé et a un contour bien défini. Elle mesure environ 45 μm pour un diamètre de 0,4 à 0,5 μm (figure 11).

L'une des principales caractéristiques des spermatozoïdes, qui est fondamentale pour son potentiel de fécondation, est sa capacité à progresser dans le tractus génital féminin à une vitesse normale allant à 25 $\mu\text{m}/\text{s}$ et à traverser les cellules de la granulosa et la zone pellucide pour parvenir à la fécondation. Cette propriété est fournie par le flagelle

Le flagelle des spermatozoïdes consiste en une structure à base de microtubules, appelée axonème, semblable au cytosquelette interne des cils vibratiles que l'on trouve à la surface de nombreux types de cellules, telles que les cellules épithéliales des voies respiratoires. Les trompes de Fallope ou les ventricules cérébraux [13].

Le flagelle du sperme peut être divisé en 3 pièces : la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale, en fonction de la présence de structures péri-axonémiques spécifiques, qui ne se trouvent pas dans les cils vibratiles (Figure 12). La pièce intermédiaire consiste en une gaine mitochondriale hélicoïdale entourant l'axonème, qui est remplacée par la gaine fibreuse de la pièce principale ; la pièce terminale est dépourvue de toute structure péri-axonémique. La pièce intermédiaire et la pièce principale sont reliées par l'annulus, également appelé anneau de Jensen, qui se présente sous la forme d'une structure en anneau dense aux électrons étroitement associée à la membrane plasmique.

L'axonème est composé de 9 doublets de microtubules disposés autour d'une paire centrale de microtubules (structure '9 + 2'). Les doublets périphériques sont reliés les uns aux autres par le complexe régulateur nexin–dynéine ; de plus, les rayons radiaux, qui sont des structures multiprotéiques en forme de T, relient chaque doublet de microtubules périphérique au complexe de paire centrale (figure 12).

Le battement des cils et des flagelles est orchestré par les bras interne et externe de la dynéine qui sont des complexes multiprotéine–ATPase, composés de chaînes lourdes, de chaînes intermédiaires, de chaînes légères–intermédiaires, de chaînes légères et de nombreuses protéines régulatrices ; et fournissent la force de glissement pour la motilité des spermatozoïdes [13].

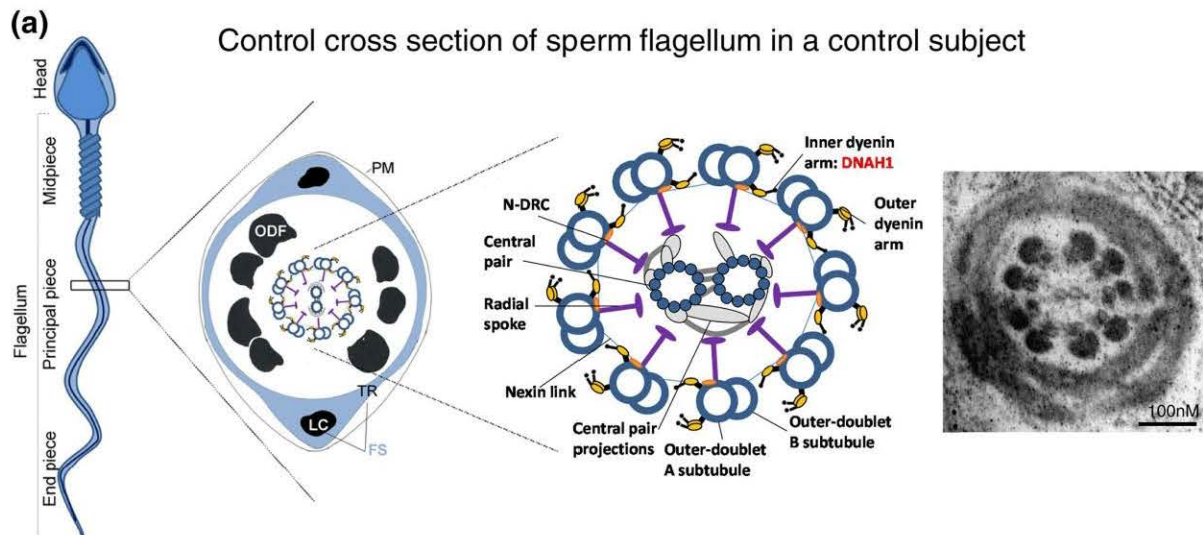


Figure 12 : Structure du flagelle du spermatozoïde

Le flagelle du spermatozoïde est divisé structurellement en 3 zones : pièce intermédiaire, pièce principale et pièce terminale.

Coupe transversale schématique d'un segment représentatif de la pièce principale montrant la membrane plasmique (PM) entourant 7 fibres denses externes (ODF), il y a 9 fibres denses externes dans la pièce intermédiaire. La gaine fibreuse (FS) est composée de 2 colonnes longitudinales (LC) qui sont reliées par des nervures ribs transversales (TR). Les composants de l'axonème sont contenus dans le fichier fibres denses externes

L'axonème est agrandi et l'offset montre : les 9 doublets de microtubules externes de l'axonème [avec les bras de dynéine interne et externe associés], les rayons radiaux, le complexe régulateur de nexine–dynéine, les liaisons de nexine et les microtubules de la paire centrale. Sur le côté droit, coupe transversale d'un flagelle EM provenant d'un échantillon de sperme individuel témoin [98].

Alors que les spermatozoïdes produits dans les testicules sont morphologiquement matures et comprennent un flagelle entièrement assemblé, ils ne sont pas encore fonctionnels, car ils ne sont pas mobiles et ne peuvent pas féconder l'ovocyte. Les battements du flagelle des spermatozoïdes reposent non seulement sur l'intégrité structurelle du flagelle et sur la disponibilité de l'ATP, mais également sur une réaction appropriée des spermatozoïdes à une série d'événements de maturation [14]. Ces événements se produisent pendant le transit dans l'épididyme et une maturation plus poussée dans le tractus génital féminin. Un dernier événement est connu sous le nom de capacitation qui induira une hyperactivation de la motilité des spermatozoïdes (augmentation de l'amplitude et de la fréquence des battements du flagelle) et permettra au spermatozoïde de réaliser la réaction acrosomique (c'est-à-dire la sécrétion d'enzymes permettant de digérer la zone pellucide entourant l'ovocyte). Tous ces événements de maturation impliquent des changements substantiels affectant les propriétés biochimiques, électrophysiologiques et fonctionnelles du spermatozoïde. L'appauvrissement en cholestérol induit la réorganisation des phospholipides membranaires et des mouvements complexes d'ions entraînent une hyperpolarisation du potentiel membranaire du spermatozoïde, une alcalinisation intracellulaire et une hyperphosphorylation des protéines (Figure 13). Les ions calcium (Ca^{2+}), chlorure (Cl^-) et bicarbonate (HCO_3^{2-}) sont indispensables à ces processus. En particulier, ces trois ions sont responsables de l'augmentation de la concentration intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et de l'activation ultérieure de la protéine kinase A (PKA) et des cascades de phosphorylation essentielles pour la capacitation et la motilité des spermatozoïdes [15] (Figure 13).

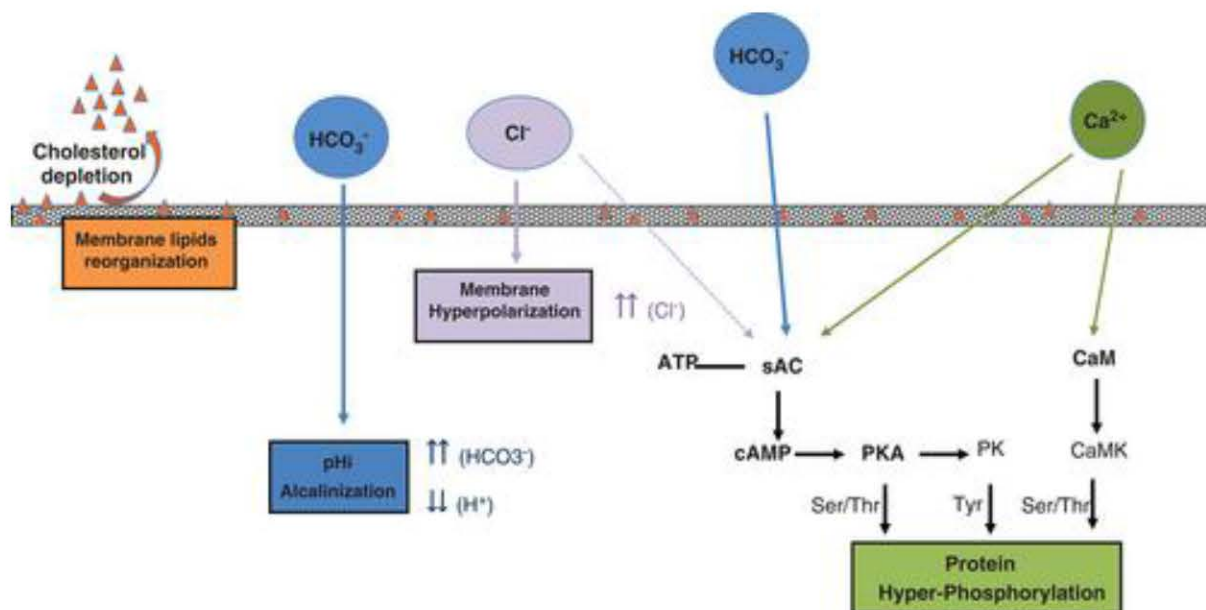


Figure 13 : les principaux mécanismes moléculaires de la capacitation des spermatozoïdes [15].

Modifications membranaires et cytoplasmiques induites par les flux ioniques. L'appauvrissement en cholestérol induit la réorganisation des phospholipides membranaires déclenchant l'ouverture de plusieurs canaux ioniques conduisant à l'hyperpolarisation du potentiel membranaire du spermatozoïde, à l'alcalinisation intracellulaire et à la phosphorylation spécifique à la tyrosine de nombreuses protéines. Le calcium (Ca^{2+}), le chlorure (Cl^-) et le bicarbonate (HCO_3^-) sont responsables de l'augmentation de la concentration intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et de l'activation subséquente de la protéine kinase A (PKA) et de la phosphorylation indispensables à la capacitation du sperme.

3.2 L'espace interstitiel et sa fonction

a. L'espace interstitiel (figure 8) :

Ce compartiment est constitué par les cellules de Leydig situées dans le tissu conjonctif lâche entre les espaces inter tubulaires. Sur le plan histologique, les cellules de Leydig apparaissent comme des cellules polyédriques de 10 à 15 micromètres de diamètre groupées autour des capillaires sanguins et entourées par une lame basale discontinue. La présence dans le cytoplasme d'un abondant réticulum endoplasmique lisse, de nombreuses mitochondries à crêtes lamellaires ou tubulaires, d'un appareil de Golgi développé et d'inclusions lipidiques sont caractéristiques d'une activité de stéroïdogénèse. Elles renferment également des enclaves pigmentaires et des inclusions protéiques spécifiques (cristalloïdes de Reinke). Les fonctions endocrines consistent de la production des hormones stéroïdes (95 % de la testostérone plasmatique) est assurée par les cellules de Leydig [16]. Chez l'adulte le nombre de cellules de Leydig est compris entre 700 et 800 millions pour les deux testicules et diminue d'environ 80 millions par décade à partir de l'âge de 20 ans.

b. La fonction endocrine des cellules de Leydig [16] :

Les cellules de Leydig synthétisent la testostérone et des substances intermédiaires de testostérone. Ces hormones sont issues d'un précurseur commun, le cholestérol. Différentes enzymes permettent la transformation du cholestérol en trois principaux stéroïdes testiculaires : la testostérone, la dihydrotestosterone et le 17- β -oestradiol.

La testostérone est le principal androgène circulant. La sécrétion globale de la testostérone est de 5 à 7,5 mg / 24h chez l'homme adulte normal. Quant à la dihydrotestosterone, c'est l'androgène actif au niveau des tissus périphériques (prostate, épидидyme, vésicule séminale) grâce à la présence de l'enzyme 5- α réductase dans ces tissus. Le 17 β estradiol sécrété par le testicule ne représente que 20 % du 17 β estradiol circulant (le reste provenant de la conversion périphérique de

la testostérone). La diminution du ratio testostérone/œstradiol peut être responsable de développement d'une gynécomastie, voir même une infertilité.

Les androgènes ont pour principales fonctions la différenciation sexuelle masculine, le développement des organes génitaux internes et externe, le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires. La testostérone agit directement pour la différenciation des canaux de Wolff, le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires. Mais la testostérone doit être métabolisée en DHT pour induire la virilisation du sinus urogénital et des organes génitaux externes, le développement de la prostate et du follicule pilosébacé à la puberté. La testostérone a, par ailleurs, une action anabolisante au niveau de tous les tissus, en particulier musculaire et osseux, et intervient dans le dimorphisme sexuel cérébral et la physiologie du comportement sexuel. En association avec la FSH, la testostérone est essentielle pour l'initiation et le maintien de la spermatogénèse. Elle agit sur les cellules de Sertoli, et sur les cellules péri-tubulaires, via des récepteurs spécifiques, stimulant indirectement la spermiogénèse par une voie paracrine.

3.3- Régulation de la spermatogénèse :

La spermatogénèse normale résulte d'un équilibre entre les processus de prolifération, de différenciation et d'apoptose des cellules germinales.

a- Régulation hormonale (figure 14)

La régulation des fonctions testiculaires est placée sous le contrôle du système hypothalamo-hypophyso-testiculaire,

Les neurones à GnRH sont des cellules neuroendocrines inhabituelles car ils proviennent de la placode olfactive en dehors du système nerveux central, puis migrent dans le cerveau au cours du développement embryonnaire. Cette voie établit un lien développemental entre le contrôle central de la reproduction et l'odorat. Une fois dans l'hypothalamus, les neurones de la GnRH se détachent de leurs guides axonaux et cessent de migrer. À la naissance, les neurones de la

GnRH ont atteint leur destination finale dans le cerveau et bon nombre d'entre eux se projettent dans l'éminence médiane, où ils libèrent le décapeptide GnRH de leurs terminaisons axonales dans le système vasculaire porte hypophysaire [17].

Les neurones à GnRH post-migratoires sont intégrés à un réseau neuronal complexe d'afférences qui envoient à ces neurones à GnRH, des informations sur les signaux de reproduction tels que les hormones stéroïdiennes et métaboliques [17].

La GnRH agit via le récepteur de la GnRH, qui est exprimé sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure. Cette action régule à la fois la synthèse et la libération des gonadotrophines, telles que l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH), qui contrôlent la maturation gonadique et la physiologie de la reproduction chez l'adulte via l'axe hypothalamo-hypophysogonadique (HPG).

L'hormone lutéinisante (LH) a pour cible les cellules de Leydig et stimule la synthèse des androgènes. L'hormone folliculo-stimulante (FSH) en association avec la testostérone agit sur les tubes séminifères par l'intermédiaire des cellules de Sertoli pour assurer l'initiation et le maintien de la spermatogenèse.

La sécrétion des 2 gonadotrophines, élaborée conjointement par les cellules gonadotropes dans les lobes antérieur et tubéral de l'hypophyse est contrôlée par un décapeptide d'origine hypothalamique qui est le GnRH. Cette hormone se fixe sur les récepteurs membranaires spécifiques des cellules gonadotropes [18].

L'activité de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique est modulée par un rétrocontrôle assuré par les hormones testiculaires de nature stéroïdienne (Testostérone) ou protéique (inhibine).

D'autres hormones circulantes peuvent participer à la régulation de la spermatogénèse, notamment la prolactine. L'hyperprolactinisme chronique provoque à une inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire et une diminution de la sécrétion de testostérone [18].

Chez l'adulte, la spermatogenèse est entièrement dépendante de LH/testostérone, et la récupération quantitative nécessite aussi de la FSH. En effet, il existe une bonne corrélation entre le taux de FSH et le nombre de spermatogonies [18].

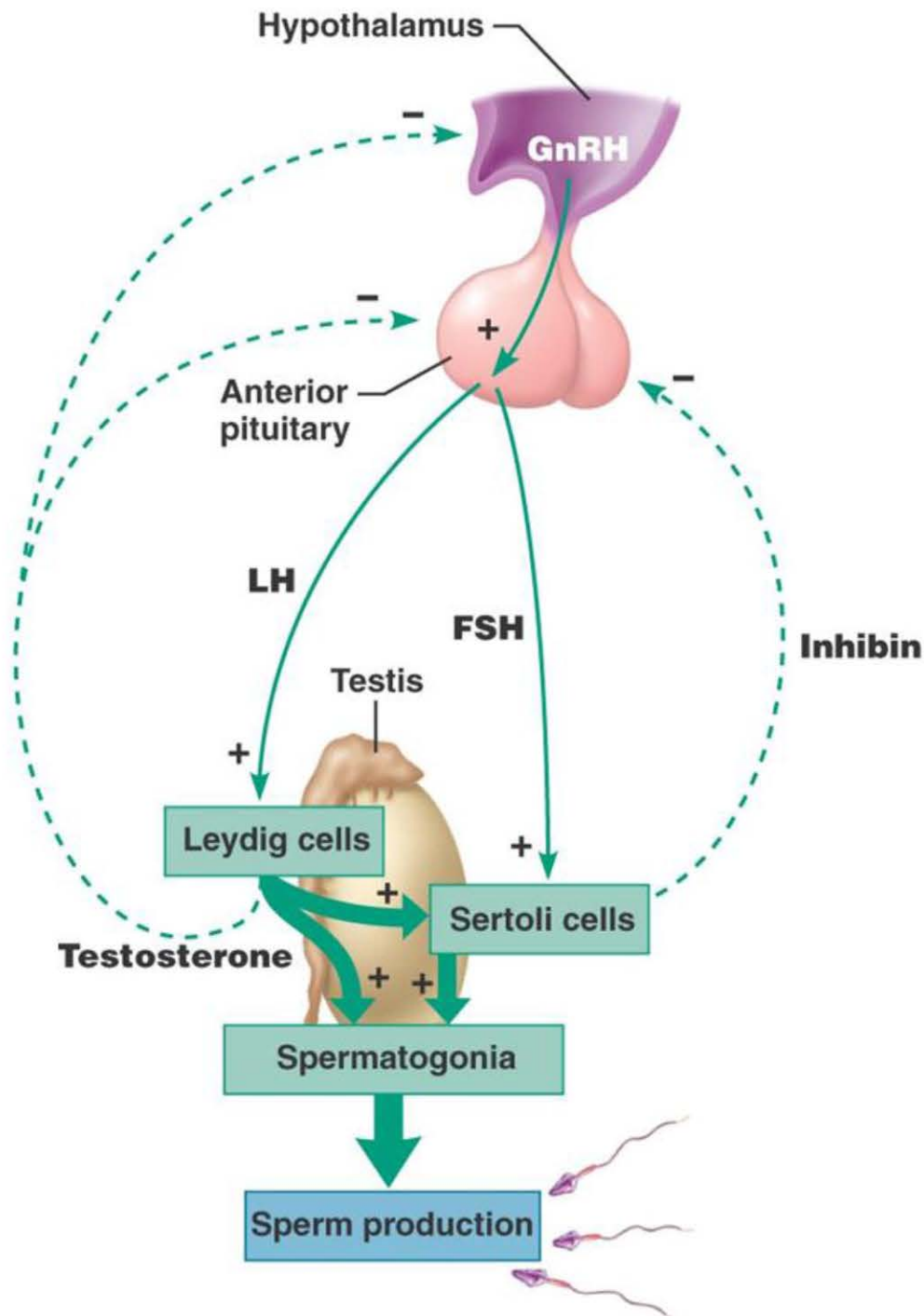


Figure 14 : La régulation hormonale de la spermatogenèse : Axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire et rétrocontrôles [6].

b- La régulation paracrine : [18]

Elle est due à des substances sécrétées par une cellule ou un groupe de cellules, qui agissent sur des cellules voisines à l'intérieur du testicule.

Ces substances sont responsables d'interactions réciproques entre les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et cellules germinales

La cellule de Sertoli synthétise un grand nombre de substances, notamment :

Les inhibines et activines :

Dans le contexte de la régulation paracrine du testicule, elles ont un rôle opposé. L'inhibine est sécrétée lorsque la production de spermatozoïdes est élevée.

Cette protéine inhibe la synthèse d'ADN et les mitoses des spermatogonies. En revanche, l'activine favorise les mitoses de spermatogonies.

L'IGF I :

Elle joue un rôle important dans la régulation des fonctions endocrine et exocrine du testicule. La part respective de l'IGF I circulant et de l'IGF I produit in situ par les cellules de Leydig et Sertoli sous influence de LH et FSH, est difficile à préciser. L'IGF I a une action mitogène sur les cellules somatiques et germinales. Il augmente le nombre de récepteurs à LH et la capacité stéroïdogénique de la cellule de Leydig. Il stimule, dans la cellule de Sertoli, la production de lactate et de l'activateur du plasminogène, facteurs importants d'interaction avec les cellules germinales.

TGF β :

Il est produit et agit sur les cellules somatiques en inhibant leurs fonctions différenciées en réponse aux gonadotrophines. Il diminue l'activité de plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse et la production de testostérone de la cellule de Leydig ; il inhibe la production de lactate de la cellule de Sertoli. Il a des effets opposés à l'IGF I.

L'EGF et TGF α :

Ce sont deux peptides proches agissant via le même récepteur et pourraient être des modulateurs de la spermiogénèse et des fonctions leydigiennes et sertoliennes.

Les IL 1 et 6 :

Elles sont sécrétées principalement par les cellules de Sertoli où elles interviendraient comme régulateurs essentiels des stades précoces de la spermatogénèse.

c- La Puberté et la reproduction

La puberté représente une période de transition de l'enfance à l'âge adulte au cours de laquelle la capacité de procréation est complète. La puberté est réglementée par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG). L'axe est actif in utero et peu de temps après la naissance (un phénomène appelé mini-puberté), est ensuite réduit au silence et reste au repos pendant des années jusqu'à son réveil au début de la puberté. Plusieurs réacteurs centraux et périphériques sont intégrés dans la réactivation pubertaire du générateur de pics de GnRH. Au début de la puberté, les impulsions de LH induites par la GnRH sont d'abord nocturnes et, progressivement, la pulsatilité s'étend au jour à mesure que la puberté progresse [19].

Chez les garçons, la FSH stimule la prolifération de cellules de Sertoli immatures et de spermatogonies, tandis que la LH stimule la production de testostérone par les cellules de Leydig. La stimulation concertée des cellules de Sertoli par la FSH et les taux de testostérone intra-testiculaire 50 à 100 fois plus élevés que dans la circulation systémique induisent l'initiation de la spermatogénèse [19].

L'inhibine B et l'AMH sont produits par les cellules de Sertoli. Les niveaux circulants d'inhibine B augmentent pendant la puberté. Chez les garçons, les concentrations d'AMH diminuent à mesure que les cellules de Sertoli se différencient et que la production de testostérone augmente. INSL3 est sécrétée par les cellules de Leydig au cours de la vie fœtale et postnatale immédiate. La sécrétion testiculaire de INSL3 décline pendant l'enfance avant de s'accroître au moment de la puberté et d'atteindre son point culminant à l'âge adulte [20].

Les premiers signes de la puberté se manifestent vers l'âge de 11,5 ans chez les garçons (augmentation du volume des testicules et spermarches : apparition de spermatozoïdes à l'absence du premier matin). Différentes variations interindividuelles dans le moment d'apparition de la puberté existe entre 9 et 14 ans chez les garçons. Par la suite, les signes de la puberté chez les garçons comprennent l'approfondissement de la voix et une poussée de croissance [21].

III- Les mécanismes de l'infertilité masculine

Les infertilités masculines peuvent être expliquées par 3 principaux mécanismes dont la fréquence est inégale :

1- Les causes hormonales dites pré-testiculaires [22] :

Les troubles hormonaux ne représentent qu'une faible part, de l'ordre de 2 % des cas d'infertilité masculine. Il s'agit d'un hypogonadisme hypogonadotrope qui empêche ou interrompt l'activation testiculaire nécessaire à la production de spermatozoïdes : Tout déficit profond primaire ou secondaire en gonadotrophines hypophysaires, quelle qu'en soit sa cause, peut être responsable à la fois d'un hypogonadisme et d'un défaut de la spermatogenèse associé à une insuffisance testiculaire endocrine (hypo-leydigisme) qui donne une symptomatologie propre : absence de développement pubertaire chez l'enfant et hypogonadisme à l'âge adulte (régression des caractères sexuels secondaires et troubles sexuels). Les

hypogonadismes hypogonadotropes peuvent être diagnostiqués par la baisse simultanée de la testostérone, et des taux de gonadotrophines LH et FSH normaux ou bas.

L'hypogonadisme hypogonadotrope peut être primaire ou secondaire. Dans ce dernier cas, Il est marqué cliniquement par une hypotrophie testiculaire, une raréfaction modérée de la pilosité et de la barbe, une gynécomastie, une diminution de la libido et de l'activité sexuelle. Les altérations spermatiques sont quasi constantes sur le spermogramme. Les perturbations biologiques endocriniennes sont variables et différentes en fonction du tableau clinique et de son étiologie. On distingue :

Les insuffisances hypothalamiques ou hypophysaires organiques acquises [23] :

Elles sont dues à une atteinte directe de l'hypothalamus ou de l'hypophyse. Parmi les causes multiples de cette insuffisance organique, on a les tumeurs hypothalamiques, les adénomes hypophysaires (la cause la plus fréquente étant l'adénome à prolactine), ce qui justifie la réalisation systématique d'une imagerie par résonance magnétique (IRM) de la région ; un processus infiltratif hypothalamo-hypophysaire (leucémies), l'hémochromatose ; infectieuse, liée à une hydrocéphalie ou encore inflammatoire, liée à une maladie systémique (sarcoïdose, histiocytose) et la radiothérapie de la région hypothalamo hypophysaire. Ces causes provoquent en général une insuffisance de sécrétion de l'ensemble des hormones hypophysaires.

Les insuffisances gonadotropes fonctionnelles [24] :

Elles sont caractérisées par une inhibition de la sécrétion de gonadotrophines. Exemple : hyperprolactinémie (inhibition sécrétion GnRH par la prolactine), anorexie mentale hyperplasie congénitale des surrénales, Il peut également avoir une origine médicamenteuse : neuroleptiques (effet hyperprolactinémiant), anti-dopaminergiques, œstrogènes à fortes doses), apport exogènes d'androgènes (dopage).

Par ailleurs, on retrouve des hypogonadismes hypogonadotropes congénitaux.

2- Les causes dites testiculaires :

Des maladies primitivement testiculaires altérant le déroulement de la spermatogenèse, Le processus pathologique se situe, dans ces cas, au niveau du testicule lui-même, avec diminution de la production de spermatozoïdes. Les altérations "quantitatives" de la spermatogenèse représentent la majorité des infertilités avec selon l'intensité du trouble, azoospermie ou oligospermie dites sécrétoires.

Parallèlement à l'oligospermie, il existe, souvent associées, des anomalies de la mobilité, de la morphologie et du pouvoir fécondant du sperme.

Dans cette catégorie, on retrouve des cas avec Hypogonadisme hypergonadotrope : Il est défini par une élévation des gonadotrophines chez un patient hypogonade. Chez le garçon, il s'agit soit d'une agénésie des gonades (constatée à l'examen clinique), soit de la conséquence d'une atteinte des gonades (radiothérapie ou chimiothérapie). Le bilan hormonal est perturbé, avec comme principaux signes, bien qu'inconstants, une FSH augmentée et une inhibine B diminuée. La biochimie séminale est normale ou montre des marqueurs globalement diminués en cas d'hypogonadisme [25].

3- Les causes dites post-testiculaires :

Des affections ou lésions empêchant l'évacuation des spermatozoïdes en dehors du testicule, ou par obstacle.

4- Les infertilités masculines idiopathiques [2] :

A côté de ces principaux mécanismes, il reste des infertilités masculines dites idiopathiques, où l'étiologie est difficile à identifier avec les outils diagnostiques actuels mais qui relèvent possiblement d'un des mécanismes ci-dessus.

Elles seraient à l'origine de près de 50% des infertilités. Il s'agit d'hommes ayant une fonction gonadotrope normale et chez qui l'exploration des voies excrétrices n'a pas permis de mettre en évidence d'obstacle. Chez ces patients le caryotype et les explorations génétiques de première ligne ne montrent pas d'anomalie. Les altérations de la spermatogenèse testiculaire sont fréquentes, ce qui suggère une maladie primitivement testiculaire.

IV- Les Facteurs de risque de l'infertilité masculine

Ils sont à rechercher d'une manière la plus précoce possible et sans attendre le délai d'un an sans grossesse les principaux facteurs de risque :

1- L'Âge : [26]

Des études démographiques ont montré que la probabilité d'avoir un enfant diminue lorsque l'âge paternel augmente. Les taux de fécondité maximale se produisent lorsque l'homme est âgé de 30 à 34 ans puis diminuent lentement avec l'âge. À l'âge de 50 à 59 ans, l'effet de l'âge paternel serait plus fort que l'effet d'un âge maternel de 40 à 44 ans. Ce constat peut être expliqué par :

a- Les modifications histologiques :

Les altérations des tubes séminifères avec le vieillissement sont confirmées par les observations morphologiques qui retrouvent une réduction et une altération des cellules de Sertoli, s'accompagnant d'un épaissement de leur membrane basale et d'une diminution de la production de spermatozoïdes jugée sur l'histologie de la lignée germinale. Le vieillissement s'accompagne également d'une hypotrophie testiculaire [26]. La diminution de facteurs de croissance, comme l'IGF-I dont l'intervention dans les fonctions testiculaires a été établie, peut aussi contribuer à l'altération fonctionnelle testiculaire.

b- Les modifications hormonales :

Le vieillissement masculin est marqué par des altérations de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire. Indépendamment de phénomènes pathologiques, on observe une diminution très progressive de la testostérone plasmatique. Si cette baisse est principalement due à une atteinte testiculaire périphérique, il existe aussi un dysfonctionnement de l'axe gonadotrope [27].

c- Les modifications des paramètres spermatiques :

Le volume, la motilité des spermatozoïdes et la proportion de spermatozoïdes normaux diminue chez les hommes âgés de plus de 50 ans [26].

L'ensemble de ces modifications anatomiques, fonctionnelles, hormonales et spermatiques apparaissant avec l'âge de certains hommes ne sont pas à elles seules responsables de la perte de fertilité. D'une manière concomitante, l'âge fait apparaître d'autres facteurs pouvant influencer sur la fertilité comme la diminution de l'activité sexuelle, l'apparition d'une dysfonction érectile, le stress, les états dépressifs réduisant la fréquence des rapports, la prise de médicaments fréquente dans la population âgée, les pathologies systémiques chroniques : diabète, HTA, dyslipidémie, affections respiratoires, pathologies inflammatoires.

2- La chaleur : [28]

L'hyperthermie scrotale et testiculaire entraîne une altération de la spermatogénèse objectivée par une oligo-astheno-téatospermie (OATS). L'intensité et la gravité de ces anomalies est en fonction du degré d'élévation et de la durée de l'hyperthermie.

Après le retour à une eutherme locale, la spermatogénèse reprend un rendement normal et de qualité au plus en 8 à 10 mois (norme évaluée pour des expositions journalières régulières pendant deux ans).

L'hyperthermie scrotale et testiculaire peut être secondaire à de nombreux facteurs extérieurs environnementaux : lieu de vie sous un climat très chaud, professions exposées à la chaleur. Le travail sur écran est souvent lié à une position assise prolongée, ce qui est susceptible d'augmenter la température au niveau des bourses.

3- Le tabac [29] :

La fumée de cigarette comprend plus de 40 composants qui sont reconnus comme étant mutagènes et carcinogènes et, ainsi susceptibles d'interférer avec la qualité des gamètes. Certaines de ces substances comme la cotinine (métabolite de la nicotine) ou le cadmium franchissent la barrière hémato-testiculaire depuis les artères testiculaires vers les tubes séminifères, et sont retrouvées dans le plasma séminal des fumeurs. Ceci explique les anomalies présentes sur les spermogrammes des patients fumeurs. On note une tendance à une diminution de la numération des spermatozoïdes, une diminution relative de la vitalité des spermatozoïdes et une augmentation de la tératospermie avec une prédominance de spermatozoïdes microcéphales.

4- L'alcool et drogues

5- Les médicaments

Les psychotropes auront essentiellement des effets sur l'activité sexuelle des patients. Une sexualité perturbée par un trouble du désir, une dysfonction érectile, un trouble de l'éjaculation (anéjaculation ou éjaculation rétrograde), aura forcément des répercussions d'une façon indirecte sur la reproduction. On se trouvera alors dans une situation d'hypofertilité. Ceci pourrait être expliqué par plusieurs mécanismes :

On distingue l'effet sédatif des drogues adrénolytiques à impact central et celles d'impact périphérique entraînant une perturbation de la fermeture du sphincter interne et une difficulté à l'émission du sperme.

Les médicaments hypotenseurs ou diurétiques peuvent, exactement comme les psychotropes, entraîner des troubles sexuels et par conséquent influencer sur la fertilité par altération de la qualité des rapports. On pourra citer comme exemple :

- L'alpha-méthyl-Dopa qui présente un effet hyperprolactinémiant et un effet sédatif adrénolytique central.
- cimétidine,
- sulfasalazine,
- lithium
- La clonidine pour le même effet central.
- Les bêtabloquants qui induisent une vasoconstriction des artères sexuelles périphériques.
- La spironolactone qui provoque une action anti androgène.

6- Les infections du tractus génital masculin : [30]

Les infections du tractus génital masculin de nature bactérienne, fongique, parasitaire ou virale, sont impliquées dans près de 15 % des infertilités masculines.

Les infections peuvent être à l'origine d'obstruction séquellaire des voies spermatiques, de production d'anticorps anti-spermatozoïdes et d'une leucospermie qui génère un stress oxydant délétère pour les spermatozoïdes entraînant une diminution de la mobilité des spermatozoïdes (asthénospermie) et une diminution de leur pouvoir fécondant, voir leur mort (nécrospermie).

Plusieurs germes peuvent être responsables d'infections et entraîner des répercussions transitoires ou définitives sur la fertilité.

6.1 – les infections virales :

a– Le virus ourlien et les autres virus responsables d'orchite : [31]

Le virus des oreillons, à tropisme glandulaire, et notamment pour les cellules testiculaires. Les cellules cibles du virus seraient les cellules de Leydig. Il est responsable d'une parotidite. Une orchite ourlienne survenue après la puberté en constitue la principale complication et entraîne une atrophie testiculaire irréversible elle survient en moyenne 4 à 10 jours après la parotidite dans 2 cas sur 1000 patients atteints des oreillons. Le tropisme glandulaire du virus peut se localiser uniquement sur les testicules sans atteinte des parotides, se manifestant par une orchite isolée. Elle s'accompagne d'une chute transitoire de la testostéronémie et par conséquent d'une augmentation de la FSH et de la LH. On observe alors une oligo-astheno-téatospermie. Ces éléments se normalisent dans la majorité des cas et une hypofertilité séquellaire ne s'installe que dans 7 à 13% des formes bilatérales d'orchite.

Une localisation strictement épидидymaire sans atteinte testiculaire a également été décrite, entraînant dans ce cas une altération de la qualité spermatique, mais pas d'azoospermie.

b– Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) :

Les orchites, l'hypogonadisme ou l'azoospermie ont été fréquemment décrits chez les hommes atteints de sida.

Ce sont les lymphocytes T et les macrophages présents dans le tissu interstitiel et dans les tubes séminifères qui sont infectés par le VIH et non les cellules germinales. Cependant, même si le VIH n'infecte pas directement les cellules germinales, il pourrait avoir un effet délétère sur la spermatogenèse notamment en provoquant une réaction inflammatoire associée aux cellules cibles infectées.

On observe alors une altération de la spermatogénèse symbolisée une détérioration de la mobilité des spermatozoïdes, ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules non spermatiques et qu'une diminution du volume de l'éjaculat et du nombre de spermatozoïdes totaux.

c- Le virus Herpès Simplex (HSV) de type 1 ou 2 :

Le virus HSV est responsable de l'herpès génital et semble jouer un rôle dans certains cas d'infertilité masculine. En effet, la présence de l'ADN des HSV a été rapportée dans 24 à plus de 50 % d'échantillons de sperme provenant d'hommes infertiles.

d- D'autres primo-infections virales

Les infections à coxsackievirus, influenzae virus, Epstein Barr virus et adénovirus peuvent aussi se compliquer d'une orchite aiguë. Ces orchites d'origine virale peuvent provoquer une atrophie testiculaire mais pas de stérilité car elles sont généralement unilatérales.

6.2- Infections bactérienne :

Les bactériospermies pathogènes (présence de bactéries dans le sperme) et les infections génitales des glandes annexes masculines peuvent retentir à des degrés divers sur la spermatogénèse, la maturation spermatique, le transport des spermatozoïdes, les fonctions migratrices et fécondantes du spermatozoïde et sur la fertilité de la partenaire en cas d'infection cervico-vaginale et/ou tubaire associée.

a- Infections à Chlamydia Trachomatis [32] :

Elle serait l'infection sexuellement transmissible la plus fréquente. Cliniquement, on retrouve une urétrite avec un parfois un écoulement clair. Elle peut se compliquer d'une orchite-épididymite aiguë responsable alors d'une altération transitoire et partielle de la fonction gonadique et de la spermatogénèse. Elle peut également se compliquer d'une obstruction épидидyme- différentielle irréversible

b- Infections à Gonocoque :

Il est responsable d'une épididymite et/ou urétrite aigue symptomatique avec écoulement purulent.

c- Syphilis :

Le germe responsable est le Tréponème Pallidum diagnostiquée par la présence d'un chancre mou au niveau du sillon balano-préputial, du méat et du prépuce.

d- Tuberculose urogénitale :

La prévalence de la tuberculose reste encore élevée au Maroc avec une incidence d'environ 30000 nouveaux cas par an. Elle survient soit par diffusion rétrograde de bacilles tuberculeux à partir de l'urètre prostatique ou des vésicules séminales, soit suite à une inoculation directe par voie hématogène. Il n'existe pas de signes cliniques spécifiques de la tuberculose génitale, ce qui rend son diagnostic difficile et tardif. Le tableau est souvent celui d'une épididymite chronique parfois d'une orchépididymite évoluant dans un contexte peu douloureux parfois associé à des signes d'imprégnation tuberculeuse. Elle peut se compliquer par une obstruction de la voie séminale, par des processus desquamatifs et infiltratifs, expliquant l'azoospermie excrétoire.

7- Les traumatismes :

L'ensemble des lésions traumatiques, traumatismes directs des testicules et/ou des organes génitaux externes, du pelvis, de l'abdomen, du bassin, peuvent entrainer des répercussions sur le fonctionnement de l'appareil reproducteur masculin et donc par conséquent sur la fertilité.

L'iatrogénie peut être également en cause à l'occasion d'une obstruction des canaux éjaculateurs sur une chirurgie du col vésical, de la prostate ou aussi une

obstruction séquellaires des canaux déférentiels suite à une cure de hernie inguinale chez le petit enfant ou encore d'une ablation de kystes séminaux ou après une chirurgie rétro-péritonéale ou d'imperforation anale.

8- Torsion du pédicule spermatique :

Elle est plus fréquente chez le nouveau-né et à l'adolescence. Elle est liée à une anomalie congénitale de fixation du pôle inférieur du testicule à la face profonde du scrotum, permettant ainsi une rotation possible autour de l'axe du cordon spermatique. L'artère spermatique se trouve alors comprimée, entraînant une ischémie du testicule. C'est une urgence urologique. L'exploration chirurgicale s'impose au moindre doute. Le traitement est chirurgical et la détorsion doit être faite dans les 6 premières heures pour éviter des lésions testiculaires irréversibles.

9- L'auto-immunisation anti-spermatozoïde :

Il s'agit d'une anomalie de physiopathologie mal connue ou il y'a production d'auto anticorps anti-spermatozoïdes par l'homme. Ces anticorps provoquent l'agglutination des spermatozoïdes entre eux ce qui diminue leur mobilité et leur pouvoir fécondant.

10- La varicocèle : [33]

Correspond à la dilatation variqueuse du plexus veineux pampiniforme antérieur du testicule avec un reflux (varices intra-scrotales). C'est une anomalie fréquente retrouvée chez 15 % de la population générale et 40 % des hommes infertiles.

La varicocèle est gauche dans 95% des cas. C'est une affection le plus souvent primitive. En cas de varicocèle acquise chez un adulte de 50-60 ans, il faut toujours

penser à un envahissement de la veine rénale gauche et rechercher un cancer du rein sus-jacent. À l'examen clinique, on retrouve une dilatation variqueuse du cordon parfois visible. À la palpation, il existe une tuméfaction scrotale turgescente en poussée glotte fermée (manœuvre de Valsalva) ou à la toux et qui disparaît en décubitus. Parfois, le patient peut se plaindre de pesanteurs scrotales, de douleurs scrotales aiguës augmentées ou déclenchées à l'effort.

La varicocèle peut altérer la spermatogénèse par augmentation de la température à l'intérieur du scrotum, mais probablement aussi par l'existence d'anomalies de la microcirculation testiculaire. L'altération du sperme dans ce cas touche la numération avec une oligozoospermie sévère, voire une azoospermie et la morphologie avec des têtes amincies (syndrome de McLeod).

Le spermogramme peut également mettre en évidence une augmentation du nombre de cellules rondes par relargage inapproprié de cellules germinales et une leucospermie associée.

La perturbation de la fonction endocrine sera confirmée indirectement par un taux de FSH élevé, un taux d'inhibine B diminué. Enfin, la varicocèle entraîne très fréquemment une hypotrophie testiculaire homolatérale.

Il n'existe aucun bénéfice à traiter une varicocèle infra-clinique, le traitement n'est proposé que selon certaines indications :

- La varicocèle est palpable.
- L'infertilité du couple.
- Une anomalie des paramètres spermatiques.

Les paramètres spermatiques peuvent être améliorés après embolisation par radiologie interventionnelle ou microchirurgie.

11- La cryptorchidie : [34]

C'est une absence de descente d'un ou des deux testicules dans le scrotum avec des testicules localisés dans la cavité abdominale ou au niveau du canal inguinal. Elle survient chez 2 % à 3 % des nouveau-nés à terme, et fréquemment retrouvée chez les patients infertiles. Elle peut être bilatérale dans 30 % des cas. Les testicules cryptorchides sont souvent normaux à la naissance, mais des altérations histologiques apparaissent fréquemment dès la première année de vie.

L'altération de la spermatogénèse peut aller d'une atteinte modérée à l'azoospermie avec syndrome de Sertoli « Cell Only » (15 à 20 % des azoospermies) et l'incidence du cancer testiculaire chez l'adulte est de 30 %.

Une origine génétique est fortement suspectée car la descente testiculaire est sous la dépendance d'un certain nombre de gènes dont la mutation entraînerait une cryptorchidie : INSL3 (facteur insulino semblable 3) et son récepteur LGR 8 (récepteur de la relaxine), AMH (anti-mullerian hormone) et son récepteur de type II, androgènes et leurs récepteur aux androgènes.

Les principaux diagnostics différentiels de la cryptorchidie sont l'ectopie testiculaire qui correspond à un testicule en position aberrante situé en dehors de son trajet de migration physiologique et l'anorchidie qui l'absence congénitale de testicule.

12- Le Cancer du testicule [35]

C'est la première cause de cancer chez des hommes jeunes entre 20 et 30 ans, survenant souvent chez des patients présentant des antécédents de cryptorchidie, ce qui est déjà un facteur d'infertilité en soi. Il peut également y avoir déficit hormonal qui altère la spermatogénèse. Il peut également y avoir des facteurs immunologiques car ces patients présentent souvent des anticorps anti

spermatozoïdes avant l'orchidectomie. La fertilité initiale des patients, avant tout traitement est altérée. Avant le traitement, 54% des patients sont oligospermiques, 13% azoospermiques, 30% et 20% ont respectivement une FSH et une LH élevée.

13– les traitements du cancer [36]

13.1– Impact de la radiothérapie sur la fertilité :

Le testicule est un organe très radiosensible. Malgré les mesures de radioprotection il peut être atteint par les rayonnements diffusés et secondaires, qui sont d'autant plus importants que la dose délivrée est forte et que la limite du champ est proche du testicule. L'effet délétère de la radiothérapie dépend de la dose reçue.

Les cellules les plus sensibles sont les spermatogonies, mais à forte dose toute la lignée germinale est atteinte. Il existe une azoospermie pour des doses supérieures à 50 Gray. Elle est réversible si la dose reste inférieure à 200 Gray. Au-delà de cette dernière limite, les lésions restent irréversibles. L'installation de l'azoospermie est différée de quelques mois, mais d'autant plus rapide que la dose reçue est importante.

13.2– Impact de la chimiothérapie sur la fertilité :

L'altération de la fertilité après traitement anticancéreux est variable. Les drogues les plus toxiques sont les agents alkylants, comme le cisplatine. La toxicité est variable selon la dose totale utilisée, de l'âge du patient, et de sa fertilité initiale. La chimiothérapie entraîne une disparition progressive de l'épithélium séminal pouvant aboutir au maximum à la persistance isolée des cellules de Sertoli. Elle est dose dépendante, et s'associe à une diminution du volume testiculaire, et une oligo puis azoospermie. Par ailleurs, une diminution de la Testostérone libre de 50%, une augmentation nette de la FSH, et une diminution paradoxale de la LH peuvent être observées.

À la fin du traitement par chimiothérapie, il faudra attendre deux ans pour qu'un patient sur deux récupère une fertilité comparable à celle initialement. L'autre moitié des patients la récupérera dans les 5 ans qui suivent. Il est à noter tout de même que 5% des malades resteront azoospermiques d'une manière définitive.

L'autoconservation du sperme doit être systématiquement proposée à tout homme atteint d'une pathologie néoplasique testiculaire ou autre pour laquelle un traitement par radio et/ou chimiothérapie sera proposé. Le recueil doit se faire rapidement bien avant la mise en route du traitement. A l'issue de celui-ci il est recommandé d'effectuer un spermogramme à distance soit un an après la fin des thérapeutiques en conservant jusqu'alors une contraception efficace.

14– Expositions professionnelles : [37]

De nombreuses substances et expositions ont été impliquées dans l'induction des troubles de la spermatogenèse avec altération des paramètres spermatiques au spermogramme. Les effets de ces gonadotoxines peuvent être réversibles ou irréversibles. On peut citer :

Les solvants : les éthers de glycols, les solvants pétroliers, le diméthylformamide et le disulfure de carbone.

Les métaux lourds : plomb, cadmium

Les pesticides : les pyréthrinoïdes, les carbamates et les organophosphorés.

Les vibrations.

Les rayonnements non ionisants ou champs électromagnétiques.

V- La démarche diagnostique avant le bilan génétique

Chacun des partenaires d'un couple essayant sans succès d'avoir un enfant depuis plus d'un an de rapports réguliers non protégés doit bénéficier d'une démarche diagnostique méthodique.

Devant un diagnostic d'infertilité masculine, et avant que le médecin traitant (généraliste, urologue, gynécologue....) prescrit une étude génétique, il doit au préalable adopter une approche rigoureuse. Tout d'abord, un interrogatoire complet dans le but d'identifier tous les facteurs potentiels d'infertilité et un examen clinique minutieux. Les examens biologiques et radiologiques permettent de conforter le ou les diagnostic(s), d'évaluer le pronostic et les possibilités de traitement de l'infertilité.

1 – L'interrogatoire [38] :

L'interrogatoire représente le temps principal de la consultation. Il doit être méthodique et éventuellement structuré pour identifier tous les facteurs potentiels d'infertilité.

1.1 Histoire reproductive :

Il convient d'interroger l'homme et le couple sur :

- La fréquence des coïts et leur calendrier.
- Les conditions et la qualité de la sexualité du couple notamment le contexte psychologique et social, la présence ou non de troubles érectiles et/ou éjaculatoires, utilisation de lubrifiants potentiellement toxiques pour les spermatozoïdes.
- La durée d'infertilité et la fertilité antérieure du couple et des deux partenaires.

- La fécondabilité et l'âge de la partenaire.
- Les pathologies de l'enfance et l'histoire du développement.
- L'absence effective de tout moyen de contraception.
- L'âge de la partenaire, ses antécédents gynécologiques, les résultats des explorations réalisées, ainsi que les traitements éventuels.

1.2 Facteurs de risques :

Il apparaît important d'interroger le patient d'une manière précise sur les facteurs de risque déjà cités. Il faut également chercher les antécédents familiaux : Existence d'autres cas d'infertilité, autres maladies génétiques, l'existence d'une mucoviscidose et des antécédents respiratoires : Dilatation des bronches, sinusites ou bronchites chroniques pouvant évoquer une dyskinésie ciliaire.

2- Examen clinique [38] :

2.1. Examen physique général :

L'inspection recherche les signes d'hypoandrisme évoquant une atteinte de la fonction endocrine testiculaire (une gynécomastie, une répartition gynoïde des graisses, une raréfaction de la pilosité pubienne et thoracique) ainsi que la recherche des cicatrices chirurgicales abdominales et/ou pelviennes.

2.2. Examen urogénital :

L'examen est réalisé sur le patient allongé puis debout et doit évaluer tout l'appareil génital : verge, testicule, épидидyme, déférent et prostate.

2.2.1 Examen des organes génitaux externes :

Il comporte :

a- L'examen de la verge :

- La position du méat : apical, hypospadias ou épispadias.
- La présence d'une éventuelle courbure du pénis.

b- L'examen des testicules :

- La localisation intra-scrotale ou ectopique des testicules.
- Le volume testiculaire : il peut être évalué par l'orchimètre de Prader. Il est corrélé à la spermatogenèse.
- Un testicule est dit hypotrophique pour un volume compris entre 6 et 15 ml, et atrophique s'il est inférieur à 6 ml. L'asymétrie entre deux testicules est significative lorsqu'elle dépasse 30 %.
- La recherche d'indurations localisées.
- La recherche d'une dilatation veineuse au niveau du cordon et du pôle supérieur du testicule gauche, majorée en position debout et lors de la manœuvre de Valsalva.

2.2.2 Examen des voies génitales :**a- La palpation des épидидymes :**

L'épididyme normal est à peine palpable avec un contour régulier, une consistance molle et une palpation indolore. L'examen recherche la présence d'une dilatation évoquant un obstacle d'aval, la présence de nodules, de kystes, ou de douleurs provoquées.

b- La palpation des canaux déférents :

À la recherche d'une agénésie congénitale bilatérale des déférents, la présence de nodules avec une consistance dure évoque une cause infectieuse. Dans notre contexte la tuberculose génitale est à évoquer en premier.

2.2.3 Le toucher rectal :

Le toucher rectal doit être systématique. Il évalue la prostate, sa souplesse et l'existence de formations kystiques. Une petite prostate peut être due à un déficit androgénique.

3– Le Bilan d'exploration de la fonction de reproduction masculine [39] :

Le premier examen à demander chez un homme présumé infertile est l'analyse de la qualité spermatique. Elle est cependant appréciée par le bilan spermatique, qui pourrait être ultérieurement complété par d'autres examens paracliniques propres à chaque patient.

3.1 Bilan spermatique :

Le recueil doit être fait au sein du laboratoire. Le sperme doit être prélevé après un délai d'abstinence sexuelle de 2 à 5 jours. Après ce délai, si la numération des spermatozoïdes augmente, en revanche leur mobilité et leur vitalité sont sensiblement diminuées. Le récipient doit être adapté au recueil et être obligatoirement stérile en cas de manipulation ou conservation des gamètes. . Le recueil par coït interrompu est à proscrire. En cas de difficulté de masturbation, on peut faire appel au recueil dans un préservatif sans spermicides.

L'éjaculation doit être précédée d'une miction et d'une toilette au savon de la verge décalottée. L'examen du recueil, qu'il est conseillé de maintenir à température ambiante, est réalisé environ 20 à 60 minutes après l'éjaculation, après la liquéfaction du plasma séminal.

Le bilan spermatique doit être répété au moins une fois et à 3 mois d'intervalle en raison des fluctuations des paramètres spermatiques dépendants des facteurs externes : fièvre, stress, fatigue ou infections intercurrentes.

3.1.1 Spermogramme :

C'est un examen biologique permettant l'analyse des différents paramètres constituant le sperme, comprenant une analyse macroscopique et microscopique du sperme.

3.1.1.1 Analyse macroscopique :

a- L'Aspect de l'éjaculat :

L'échantillon liquéfié est normalement d'aspect laiteux (gris opalescent). Il peut être plus translucide s'il contient peu de spermatozoïdes. Si l'échantillon contient des érythrocytes, il peut être de couleur rouge brunâtre. Il peut également avoir une coloration plus jaunâtre si le patient souffre d'ictère ou prend certains suppléments de vitamines ou médicaments [39].

b- La Viscosité :

Le sperme de viscosité normale se coagule dès l'émission et se liquéfie dans un délai de 30 à 60 minutes grâce aux enzymes protéolytiques d'origine prostatiques devenant visqueux. Une liquéfaction différée (supérieure à 1 heure) voire impossible avec une hyperviscosité témoignent d'une dysfonction prostatique. La mesure de la viscosité est faite grâce à une baguette en verre que l'on trempe dans le flacon contenant le sperme (méthode de HOTCHKISS).

Le sperme est dit :

- De viscosité normale si la goutte s'étire à l'extrémité de la baguette.
- •Hypo visqueux si la goutte se détache immédiatement.
- Hyper visqueux si la goutte reste suspendue à l'extrémité de la baguette.

c- Le volume spermatique :

Il est normalement compris entre 1,5 et 6 ml pour 3 jours d'abstinence sexuelle. Il est le reflet des capacités sécrétoires des glandes annexes.

Les anomalies du volume spermatique sont :

- **L'aspermie** : C'est l'absence totale d'éjaculat ou un volume de sperme inférieur à 0,5 ml. Elle peut être à cause d'une éjaculation rétrograde ou en cas d'anéjaculation.

- **L'hypospermie** : volume entre 0,5 ml et 1,5 ml. Elle peut être due soit une abstinence très courte, un déficit de sécrétion glandulaire, une agénésie vésiculaire ou à un hypogonadisme.
- **L'hyperspermie** : Volume total de l'éjaculat supérieur à 6 ml, elle évoque la présence de lésion infectieuse des glandes annexes et en particulier des vésicules séminales. Elle peut être due aussi à une abstinence trop longue.

d- **Le PH spermatique** :

L'éjaculat est un mélange de sécrétions prostatiques acides (blanchâtres) et de sécrétions vésiculaires alcalines (jaunâtres). Le pH d'un échantillon de sperme augmente au fil du temps, il faut alors idéalement mesurer ce paramètre moins de 30 minutes après l'éjaculation, sans dépasser une heure.

- Un pH acide $< 7,2$ traduit une insuffisance ou une absence de sécrétions vésiculaires et peut aussi indiquer une possible contamination de l'éjaculat par de l'urine.
- Un pH basique $> 7,8$ évoque une insuffisance prostatique (prostatite chronique).

3.1.1.2 Analyse microscopique :

a- **Concentration et nombre de spermatozoïdes** :

La concentration désigne le nombre de spermatozoïdes, exprimé en millions, dans un millilitre d'éjaculat. La valeur absolue désigne le nombre de spermatozoïdes dans l'échantillon complet et se calcule en multipliant la concentration des spermatozoïdes par le volume de l'éjaculat. Elles sont toutes deux considérées comme de bons indicateurs des chances de conception. Toutefois, la valeur absolue constitue un meilleur indicateur de la fonction testiculaire, car, contrairement à la concentration, elle ne dépend pas du volume de sécrétions produites par les glandes accessoires [39].

La concentration spermatique normale doit être supérieure à 15 millions de spermatozoïdes par millilitre d'éjaculat et supérieur à 39 millions dans la totalité de l'éjaculat.

Les anomalies de la numération spermatique sont :

- L'azoospermie : c'est l'absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Elle peut être d'origine obstructive (présence d'un obstacle sur les voies excrétoires) ou sécrétoire (altération de la spermatogénèse).
- L'oligospermie : Une concentration spermatique inférieure à 15 millions par millilitre d'éjaculat.
- La cryptozoospermie : présence de très rares spermatozoïdes, inférieurs à 100.000 dans la totalité de l'éjaculat.

A côté des spermatozoïdes, un spermogramme s'intéresse à la numération des cellules rondes correspondant aux cellules germinales immature et aux leucocytes. Les leucocytes spermatiques sont identifiés parmi les cellules rondes par coloration immuno-histochimique ou anticorps monoclonaux. Un éjaculat devrait normalement en contenir moins de 1 million par ml. Une concentration supérieure ou égale à 1 million par ml correspond à une leucospermie. Une leucospermie n'est pas forcément la traduction d'une infection génitale, mais il faut bien sûr la rechercher, et à l'inverse une infection génitale ne s'accompagne pas toujours de leucospermie.

La présence d'une grande quantité d'érythrocytes est souvent suspectée par la couleur rougeâtre (sang frais) ou brunâtre (épanchement sanguin moins récent) du sperme. Normalement, le sperme ne devrait pas contenir d'érythrocytes. La présence de quelques érythrocytes dans un éjaculat n'a pas nécessairement d'incidence clinique [39].

b- La mobilité :

La mobilité est un des paramètres les plus importants pour l'appréciation du pouvoir fécondant du sperme. L'évaluation doit être quantitative, exprimée en pourcentage de formes mobiles, mais aussi analytique, prenant en compte le type de mouvement et la vitesse de déplacement des spermatozoïdes.

L'OMS a défini 4 grades de mobilité :

- Le grade (a) correspond à une mobilité normale rapide et progressive ;
- le grade (b) pour une mobilité diminuée lente ou faiblement progressive.
- Le grade (c) caractérisés par des mouvements sur place et non progressifs ;
- le grade (d) les spermatozoïdes sont immobiles.

Un éjaculat normale doit contenir au moins $\geq 32\%$ de spermatozoïdes avec une mobilité progressive de type (a+b) ou $\geq 40\%$ de type (a+b+c). Ainsi, l'asthénospermie est définie par un pourcentage $< 32\%$ de spermatozoïdes avec mobilité progressive.

Ces analyses fines du mouvement se font de façon automatisée (vélocimètre).

Une Agrégation non spécifique des spermatozoïdes qui sont regroupés en agglomérations peut influencer sur la proportion de spermatozoïdes mobiles observée [39].

c- La Vitalité :

La vitalité correspond au pourcentage de spermatozoïdes vivants. Elle est évaluée par le test à l'éosine-nigrosine réalisé à la première heure qui colore en blanc les têtes des spermatozoïdes vivants et en rouge les têtes des spermatozoïdes morts. Le taux de cellules blanches correspond au pourcentage du taux de vitalité. La vitalité spermatique normale doit être égale ou supérieure à 58 % de l'ensemble des spermatozoïdes. La présence d'une proportion importante de spermatozoïdes morts dans le sperme éjaculé (nécrospermie) est le plus souvent idiopathique. Dans ce type de nécrospermie la biopsie testiculaire permet souvent de trouver des spermatozoïdes encore vivants au niveau des tubes séminifères [40].

3.1.2 Spermocytogramme :

Pratiqué au décours du spermogramme, le spermocytogramme permet une analyse cytologique et morphologique des spermatozoïdes sur étalements fixés et colorés avec une évaluation du pourcentage de gamètes morphologiquement normaux ainsi que de l'incidence des différents types d'anomalies morphologiques.

Compte tenu de l'inhomogénéité du sperme humain et de la faible fréquence de certaines anomalies, 100 spermatozoïdes au minimum doivent être classés pour fournir une évaluation correcte du pourcentage de spermatozoïdes typiques et du profil des différentes atypies. La référence étant 200 spermatozoïdes. Cette recommandation est cependant parfois impossible à suivre lorsque la concentration de spermatozoïdes est très faible. Dans ces cas, la classification peut être faite à partir des spermatozoïdes disponibles, mais le résultat pour les spermatozoïdes normaux et anormaux ne doit pas être rendu en pourcentage et la conclusion doit tenir compte de la fiabilité diminuée des fréquences des anomalies retrouvées, notamment lorsqu'il s'agit d'anomalies rares [39].

3.1.2.1. Les anomalies morphologiques :

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont généralement polymorphes, hétérogènes touchant généralement à la fois la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle mais l'accent est mis sur les anomalies de la tête en raison de leur association fréquente aux anomalies de l'ADN [39].

L'évaluation des anomalies morphologiques dépend de la méthodologie utilisée. Deux principales classifications sont actuellement utilisées : la classification de Kruger recommandée par l'OMS et la classification de David modifiée.

a- Classification de Kruger : [41]

Par ordre d'importance, l'anomalie est recensée d'abord sur l'acrosome, puis viennent dans l'ordre les anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire et du

flagelle. Aussitôt qu'une anomalie est recensée, le spermatozoïde est directement classé dans les « anormaux ». L'absence totale d'anomalie définit le spermatozoïde typique.

3 groupes ont ainsi été individualisés en fonction du pourcentage de spermatozoïdes typique :

- > 14 % : sperme normal. le taux de fécondation en AMP est d'environ 82.5%,
- De 4 à 14 % : groupe de bon pronostic de pouvoir fécondant.
- < 4 % : tératozoospermie = groupe de mauvais pronostic de pouvoir fécondant.

L'index de tératozoospermie peut être calculé. Il correspond au nombre moyen d'anomalies par spermatozoïde anormal. Une valeur supérieure à 1,46 est prédictive d'une hypofertilité.

La classification de Kruger est décrite comme étant plus sévère et plus discriminante que les autres classifications [42].

b- **Classification de David modifiée** : [43]

Cette classification recense en dehors des spermatozoïdes morphologiquement normaux (figure 15) :

- **7 anomalies de la tête** : têtes allongées, amincies, microcéphales, macrocéphales, multiples, acrosome anormal ou absent et base (région post acrosomique) anormale.
- **3 anomalies de la pièce intermédiaire** : reste cytoplasmique, pièce intermédiaire grêle, pièce intermédiaire angulée.
- **5 anomalies de la pièce principale** : absente, écourtée, de calibre irrégulier, enroulé et multiple.

La classification de David modifiée considère comme valeur normale :

- Un pourcentage inférieur à 35% d'atypies de la tête.
- Un pourcentage inférieur à 20% d'atypies de la pièce intermédiaire.
- Un pourcentage inférieur à 20% d'atypies du flagelle.
- Un pourcentage inférieur à 10% d'atypies doubles.

On peut calculer l'index d'anomalies multiples qui correspond au rapport du nombre total d'anomalies recensées au nombre total de spermatozoïdes anormaux. Il est donc un indicateur du nombre moyen d'anomalies associées par spermatozoïde anormal. Toute valeur de l'index d'anomalies multiples supérieure à 1.6 est prédictive d'infertilité.

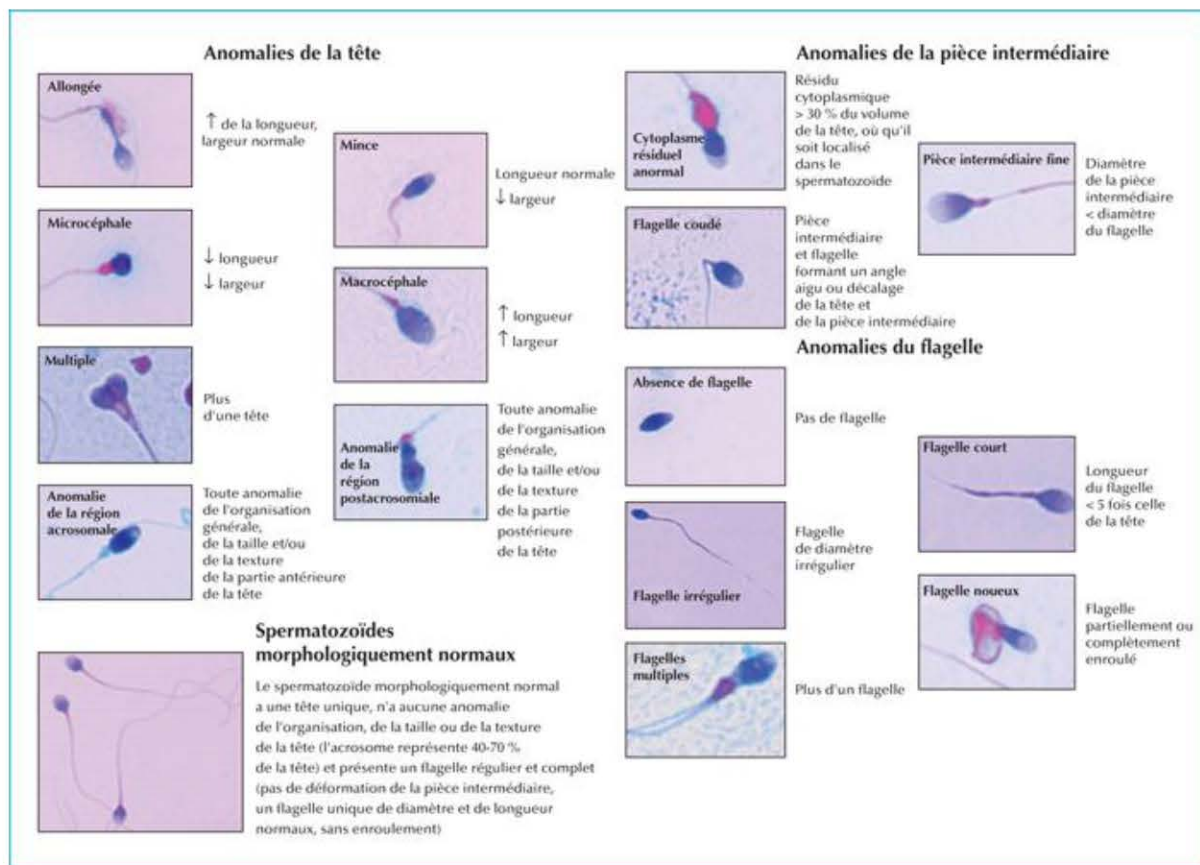


Figure 15 : Les différentes anomalies morphologiques du spermatozoïdes décrites par la classification de David modifiée [43].

3.1.2.2. Intérêt clinique de l'analyse cyto-morphologique des spermatozoïdes

[44] :

La morphologie du spermatozoïde constitue un paramètre important dans l'exploration de la qualité du sperme d'un homme infertile. Il permet parfois de poser le diagnostic étiologique.

Certaines anomalies ont une valeur étiologique comme les flagelles «enroulés» évocateurs d'une cause infectieuse et les têtes à formes allongées fréquemment associées aux varicocèles, ainsi que sur les troubles de la fonction épидидymaire se traduisant essentiellement par des macrocéphalies et des anomalies de l'acrosome. D'autres ont une valeur pronostique quant à fécondance du sperme comme les anomalies majeures du flagelle ou l'absence d'acrosome.

Enfin, la morphologie spermatique joue un rôle significatif dans les résultats de l'aide médicale à la procréation. Elle est reconnue comme étant le facteur le plus prédictif sur les résultats de FIV pour un nombre important d'auteurs. Des données récentes suggèrent que le clivage des blastomères dépend de façon significative des spermatozoïdes et que cet effet pourrait être plutôt lié à la morphologie des spermatozoïdes qu'à leur nombre ou à leur mobilité, soulignant ainsi l'importance de la sélection des gamètes morphologiquement normaux, à défaut les moins anormaux avant toute fécondation assistée.

3.1.3. Tests de migration-survie :

Le test de migration survie, aussi appelé test d'aptitude à l'AMP ou test de migration sélective, est réalisé en cas d'oligo-astheno-tératospermie. Il permet la sélection des spermatozoïdes mobiles et viables qui pourront être utilisés en assistance médicale à la procréation.

Les deux principales méthodes de sélection sont la centrifugation sur gradient de densité (figure 16), et la migration ascendante avec ou sans centrifugation. La survie à 24 heures des spermatozoïdes sélectionnés est un facteur pronostique favorable pour la fécondance du sperme [39].

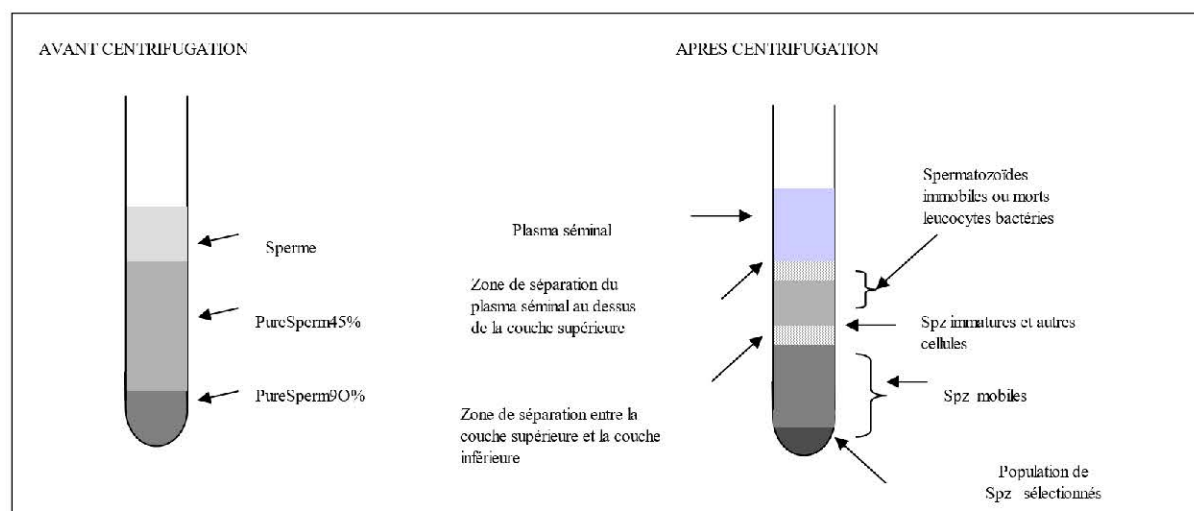
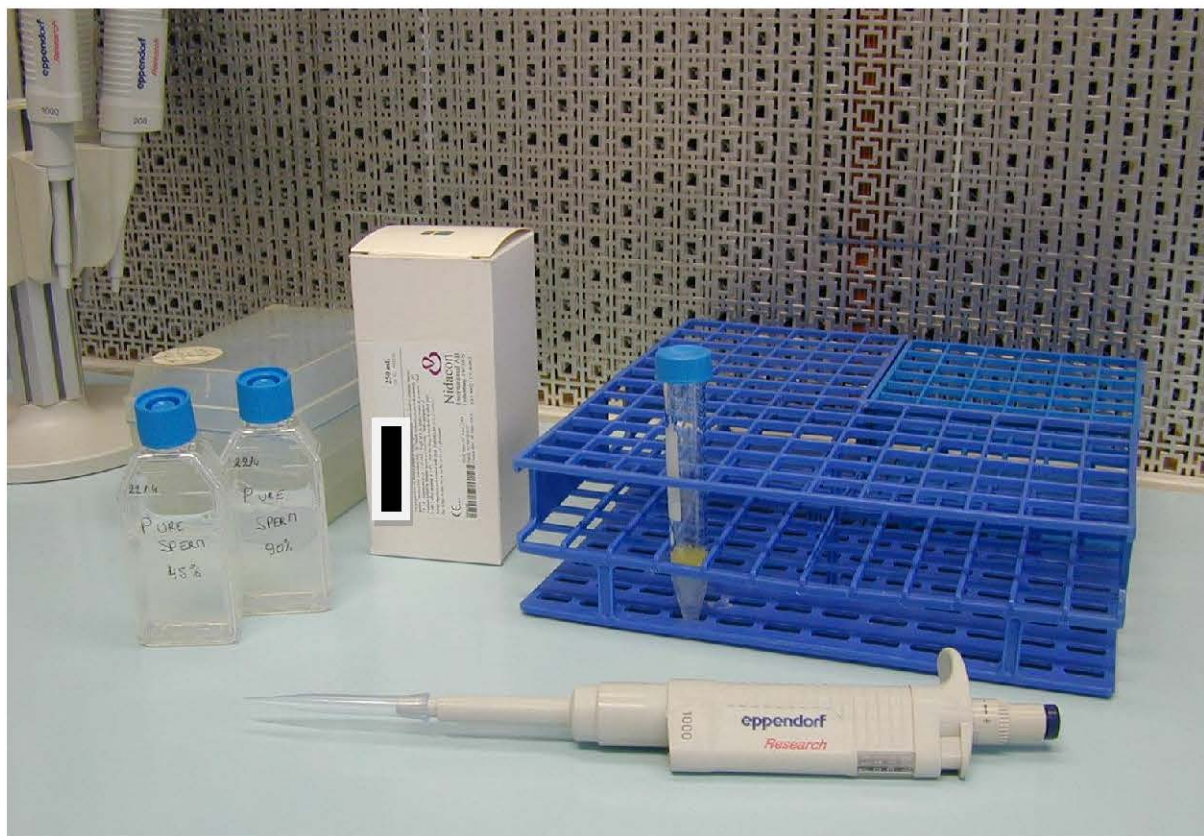


Figure 16 : En haut : Photo de la technique de migration sur gradient de densité [aimablement fournie par Pr Mohammed SEKAL].

En bas : le principe de la migration sur gradient de densité.

3.1.4. Bilan d'auto-immunisation anti-spermatozoïdes :

L'auto-immunisation est recherchée en cas d'auto agglutinats spontanés des spermatozoïdes liés les uns aux autres par la tête, le cou et/ou le flagelle, en cas d'asthénospermie, de nécrospermie, de stérilité inexplicée, d'antécédents de chirurgie urogénitale, d'obstruction congénitale ou acquise, d'infection ou inflammation génitale et en cas d'échec de fécondation in vitro [45].

La réaction d'agglutination mixte (MAR-test), très sensible, permet le dépistage de l'auto-immunisation de surface. Le test de fixation d'immuno-billes différencie le type d'immunoglobulines (A, G ou M) de surface et la partie du spermatozoïde recouverte par les anticorps. Le rôle de l'auto-immunisation dans l'infertilité est probable si plus de 40 % des spermatozoïdes mobiles sont recouverts d'anticorps. Le facteur limitant la réalisation de ces deux tests est le nombre de spermatozoïdes mobiles dans l'éjaculat [46].

3.1.5 La Spermoculture : [30]

Ce test est le seul apport de la microbiologie dans ce vaste domaine d'embryologie médicale. Il est indiqué en cas de pH séminal basique, d'hyperspermie, de leucospermie (plus de 1 million de leucocytes par millilitre), d'astheno-téatospermie, d'antécédents infectieux et avant toute technique d'aide médicale à la procréation.

Les espèces les plus fréquemment isolées sont : chlamydia trachomatis, neisseria gonorrhée, Echerichia Coli, Uraplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, Gardnerella vaginalis et Corynebacterium seminale. Une recherche de germes anaérobies est parfois nécessaire. Une culture est considérée positive si la concentration en germes dépasse un seuil défini pour chaque espèce bactérienne.

3.1.6 La Biochimie du plasma séminal :

Le dosage des marqueurs séminaux est réalisé dans le liquide séminal qui constitue la fraction liquidienne du sperme. Il est effectué en cas de perturbations du volume du sperme, devant un trouble du pH et/ou de la viscosité du liquide séminal, une asthénospermie, une oligospermie, une azoospermie ou encore une suspicion d'une atteinte infectieuse et/ou inflammatoire du tractus génital. Les principaux marqueurs séminaux :

- La L-carnitine et l'alpha-glucosidase sont deux marqueurs caractéristiques de l'épididyme dont les concentrations physiologiques atteignent un minimum de 20 mU/éjaculat. Ils sont diminués en cas de lésion épидидymaire ou d'obstacle en aval.
- Le fructose est un marqueur caractéristique des vésicules séminales avec un taux moyen supérieur à 13 micromoles/éjaculat. Une baisse du fructose associée à un pH acide est le signe d'une agénésie des vésicules séminales ou d'une obstruction des canaux éjaculateurs.
- L'acide citrique et les phosphatases acides sont ceux de la prostate avec des dosages dépassant les 50 micromoles/éjaculat pour le premier et 200 U/éjaculat pour le second.

Enfin, l'ensemble de ces marqueurs pourra être diminué d'une manière isolée ou couplée dans tout contexte infectieux. Dans cette situation particulière, il est possible de les doser une deuxième fois à distance, après traitement, afin d'en évaluer une cinétique et de visualiser l'évolution du processus inflammatoire au niveau du tractus génital [47].

3.2. la Recherche d'une éjaculation rétrograde : [48]

L'éjaculation rétrograde est surtout suspectée en cas d'hypospermie ou d'aspermie. Ce test permet de différencier l'éjaculation rétrograde complète de l'anéjaculation.

Le patient recueille ses urines debout, vessie pleine après un orgasme. On recherche ensuite dans le prélèvement des spermatozoïdes à l'examen direct et après centrifugation en appréciant leur concentration, leur mobilité et leur vitalité. L'éjaculation rétrograde est retenue si le nombre de spermatozoïdes retrouvés dans les urines est supérieur à celui de l'éjaculat.

3.3. Bilan hormonal : [49]

La réalisation d'un bilan hormonal est recommandée s'il existe :

- une azoospermie ou une oligozoospermie sévère (< 10 millions/ml).
- Une baisse de la fonction sexuelle
- Des signes cliniques évocateurs d'une endocrinopathie notamment un hypogonadisme ou une hyperthyroïdie.

a- Dosage sérique de la testostérone :

Pour évaluer le taux de testostérone, plusieurs dosages sont disponibles :

- la testostérone totale : testostérone libre plus testostérone liée à l'albumine et Sex Hormone Binding Globulin (SHBG).
- La testostérone libre, non liée aux protéines, représente 2 à 3% de cette hormone. Son dosage se fait directement ou par calcul après mesure de la testostérone totale et de la SHBG.
- La testostérone biodisponible : testostérone libre plus testostérone faiblement liée à l'albumine.

Cependant, il existe des variations plasmatiques de testostérone dépendantes de l'âge, du sexe, et de la présence ou non d'une pathologie intercurrente.

Un taux de testostérone totale normal doit être supérieur ou égal à 3,45 ng/ml. Il existe un hypogonadisme si le taux est inférieur à 2 ng/ml. Entre les deux, il est utile de réaliser un dosage de testostérone libre pour distinguer un eugonadisme d'un hypogonadisme. Un taux de testostérone libre égal à 65 ug/ml et biodisponible égal à 1,5 ng/ml sont considérés comme les normes inférieures à la normale. La difficulté de ce dosage est majorée par le caractère pulsatile de la sécrétion de testostérone chez les sujets normaux qui peuvent présenter parfois des nadirs compris entre 2 et 3 ng/ml, d'où l'intérêt de refaire un nouveau dosage en effectuant le prélèvement entre 8 heures et 10 heures du matin et en y associant un dosage de SHBG et/ou dosage de testostérone bio disponible.

b- **Dosage de l'inhibine B :**

La concentration sérique de l'inhibine B est corrélée à la concentration et la mobilité des spermatozoïdes éjaculés et au volume testiculaire. Son taux chez l'homme fertile est de 94 à 327 g/ml.

Elle sera notamment demandée dans le cadre d'une azoospermie sécrétoire pour laquelle nous devons évaluer la probabilité de rentabilité d'une biopsie testiculaire.

c- **Dosage de la FSH :**

Son taux chez un homme fertile se situe entre 1,3 et 8,4 UI/l. Le dosage de la FSH permet d'évaluer la fonction de cellules de Sertoli. Ce dosage permet de distinguer l'origine secondaire d'un hypogonadisme (déficit hypothalamohypophysaire ou hypogonadotrope) ou primaire (déficit testiculaire ou hypergonadotrope), et aussi de différencier entre une azoospermie sécrétoire (taux diminué ou augmenté selon le siège de l'atteinte) et une azoospermie excrétoire (taux normale).

d- Dosage de la prolactine :

En cas d'hypogonadisme hypogonadotrophique, La prolactine est mesurée en deuxième intention.

L'hyperprolactinémie peut être secondaire à la prise de médicaments comme les neuroleptiques. Mais surtout due à un adénome hypophysaire à prolactine.

3.4. Bilan radiologique :**a- Echographie-doppler couleur du contenu scrotal [50] :**

Une échographie du contenu scrotal doit explorer le testicule, les épididymes et les voies spermatiques. Le radiologue mesure le volume testiculaire. La valeur seuil pour le diagnostic d'hypotrophie testiculaire est fixée à 16 ml.

L'échographie testiculaire dans le bilan étiologique d'une azoospermie est d'autant plus importante qu'il a été clairement démontré qu'il existait un lien entre cancer du testicule et infertilité masculine. La recherche d'une varicocèle est également systématique. Il faut rechercher les microlithiases, les calcifications du parenchyme testiculaire et les nodules hypoéchogènes solitaires et localiser une cryptorchidie. Il peut s'agir dans ce cas d'une petite tumeur séminomateuse ou non séminomateuse, d'une tumeur à cellules de Sertoli ou de Leydig qui ont une évolution imprévisible dont le diagnostic est essentiellement histologique.

Au niveau de l'épididyme, l'échographie diagnostique des kystes épидидymaires ou des spermatocèles (lésions kystiques asymptomatiques contenant des gamètes), des dilatations de la tête et confirme les agénésies déférentielles dans la plupart des cas dépistées lors de l'examen clinique.

b- Echographie endorectale et imagerie par résonance magnétique du carrefour prostatovésiculodéférentiel avec antenne endorectale:

Ils permettent l'exploration du carrefour vésiculo-prostatique dans les cas d'hypospermie, d'anomalie du toucher rectal, d'oligoasthénospermie ou d'antécédents infectieux. Ces examens apprécient la zone transitionnelle

prostatique, permet le diagnostic d'agénésie des vésicules séminales et des ampoules déférentielles. L'obstruction des canaux éjaculateurs peut se révéler par leur dilatation ($> 2,3$ mm) et par celle des vésicules séminales (> 15 mm), mais aussi par la mise en évidence d'une cause (utricule prostatique, kyste, tumeur, séquelles de prostatite).

Elle est affirmée par la ponction et l'injection des vésicules séminales. Le diagnostic d'obstruction des canaux éjaculateurs repose alors sur la présence de spermatozoïdes intra-vésiculaires, les images d'obstruction de la vésiculographie ou l'absence de passage dans l'urètre du colorant injecté dans les vésicules séminales [51].

MATERIEL ET METHODES

Il s'agit d'une étude observationnelle descriptive et transversale d'une série de cas. Elle s'intéresse aux patients adressés pour infertilité à l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique. Les patients doivent avoir comme critère d'inclusion, une perturbation des paramètres spermatiques au spermogramme.

Le recrutement des patients concerne une période de 10 ans, de septembre 2009 à Septembre 2019.

Les patients ont bénéficié d'une consultation spécialisée et d'un ou de plusieurs tests génétiques disponibles dans notre unité.

I-Caryotype métaphasique sur sang

Le sang total est recueilli stérilement sur un tube hépariné est incubé 70 heures dans un milieu de culture contenant une lectine à fort pouvoir mitogène (phytohémagglutinine) pour les lymphocytes sanguines ainsi que des antibiotiques pour éviter la pullulation microbienne.

L'étape suivante consiste à bloquer les cellules en métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes. Pour cela, on utilise un poison du fuseau de division (Colchicine) qui empêche la progression de la mitose vers l'anaphase en bloquant la polymérisation des tubulines dans les microtubules.

Les cellules sont alors plongées dans une solution hypotonique de KCl, ce qui entraîne leur gonflement suivi de l'éclatement de membrane nucléaire et la dispersion des chromosomes. Cette étape est indispensable à l'obtention d'un étalement correct des chromosomes.

L'étape suivante consiste en une fixation par un mélange d'alcool et d'acide acétique pendant 30 minutes à températures ambiante. Cette acidification du milieu permet l'arrêt du choc cellulaire.

La répétition des fixations élimine les débris cellulaire avec un bon lavage des lymphocytes.

La préparation est alors étalée en laissant tomber quelques gouttes de la suspension cellulaire sur une lame propre. Puis, les lames étalées sont séchées à l'air libre puis remises à l'étuve à 37°C pour parfaire la fixation et permettre une meilleure dénaturation. Lorsque l'on colore des préparations chromosomiques avec du Giemsa, les chromosomes prennent un aspect rose violacé à peu près homogène sur toute leur longueur. On ne peut donc les distinguer les uns des autres que par leur taille et leur forme. Cependant, ces critères sont insuffisants pour assurer la reconnaissance et l'interprétation correcte des anomalies chromosomiques.

Pour reconnaître spécifiquement chaque paire chromosomique, on utilise donc des techniques de marquage particulières qui permettent d'obtenir une coloration inhomogène des chromosomes par le Giemsa et l'apparition de bandes. C'est la succession de bandes sombres et claires le long d'un chromosome, identique chez tous les individus pour un chromosome donné, qui en permet l'identification précise, selon le même principe qu'un code à barres. La technique de marquage en bandes des chromosomes utilisée est le banding **R**, obtenues par dénaturation thermique ménagée.

Les chromosomes métaphasiques sont constitués d'un bras court (noté p) et d'un bras long (noté q), reliés entre eux par le centromère qui correspond à un étranglement situé à un niveau variable du chromosome et qui sert de point d'attache au fuseau de division pendant la division cellulaire.

Un logiciel va permettre de classer les différents chromosomes ainsi obtenu sous un ordre de taille décroissant selon la classification international (ISNG). Plusieurs critères vont permettre de reconnaître et de classer les chromosomes :

- la taille, Par convention, les chromosomes sont classés du plus grand au plus petit.
- l'index centromérique (IC), c'est-à-dire le rapport entre la taille du bras court et la taille totale du chromosome ($p/p+q$). Cet index permet de reconnaître trois familles de chromosomes :
 - Les chromosomes métacentriques dont les deux bras ont une taille à peu près équivalente ($IC = 1/2$) : centromère au milieu (chromosomes 1, 3, 16, 19 et 20).
 - Les chromosomes submétacentriques qui ont un bras franchement plus petit que le bras long ($0 < IC < 1/2$) : centromère en position intermédiaire
 - Les chromosomes acrocentriques dont le bras court est quasi inexistant)) ($IC \approx 0$) : centromère terminal (13, 14, 15, 21, 22)
- Les bandes chromosomiques, qui sont caractéristiques de chacune des paires. Le nombre de bandes visibles est variable d'une mitose à l'autre et dépend du niveau de condensation du chromosome. Plus les chromosomes sont condensés, moins on peut observer de bandes et moins l'analyse permet de dépister des anomalies de petite taille. Le nombre de bandes par lot haploïde (c'est-à-dire pour 23 chromosomes) permet de définir la résolution de l'analyse cytogénétique ; Un caryotype standard a une résolution de 300 à 550 bandes.

II- Analyse par hybridation in situ en fluorescence (FISH)

1- Principe

Cette technique repose sur trois propriétés de l'ADN :

- ❖ La complémentarité obligatoire des bases azotées (Adénine—Thymine ; Cytosine—Guanine).
- ❖ Les liaisons hydrogènes faibles (covalente) qui assurent la cohésion des deux brins de la double hélice.
- ❖ Les liaisons phosphodiester (40 fois plus fortes que les liaisons hydrogènes) qui assurent la stabilité de l'enchaînement des nucléotides de chaque brin d'ADN.

2- Substrats de la FISH

Le substrat est une préparation chromosomique de noyaux interphasiques d'étalement cellulaires.

3- Principes de la technique

Dans certaines conditions de température, de pH ou de salinité, les 2 brins d'une molécule d'ADN peuvent se séparer généralement par la chaleur (phénomène appelé dénaturation) puis se réassocier de façon spécifique (étape appelée hybridation).

Un fragment d'ADN appelé « sonde » est « marqué » par intégration par voie chimique d'un nucléotide (dUTP), sur lequel est directement fixé un fluorochrome par Random-priming ou Nicktranslation. Cette sonde est alors dénaturée, puis hybridée sur des préparations chromosomiques, elles aussi préalablement dénaturées. Cette hybridation se déroulera dans des conditions précises de température, pH et salinité. Un appareil nommé « thermobrite » est utilisé pour

garder la préparation à s'hybrider à la température requise. L'efficacité de cette étape dépend du temps d'hybridation et de la concentration de la sonde. Le temps d'hybridation varie de 5 minutes pour des sondes centromériques, à 24 ou 48 heures pour les sondes plus complexes comme les sondes de peinture.

Un traitement à la pepsine avec des lavages post hybridation sont nécessaires pour éliminer les hybridations non spécifiques et diminuer le bruit de fond de la préparation.

4- Sondes utilisées

On utilise des sondes spécifiques de régions chromosomiques ou des sondes capables de s'hybrider sur les bras d'une paire chromosomique donnée ou loci particuliers. Nous utilisons 2 catégories de sondes :

- **Les sondes CEP (Chromosome Enumeration Probe)** composées de séquences alphoides des centromères X et Y : Elles sont des séquences spécifiques de petite taille (moins de 1000 paires de bases) d'ADN répété en tandem sur plusieurs centaines de kilobases. Elles génèrent des signaux ponctuels de forte intensité car la sonde s'hybride sur chacune des séquences complémentaires au niveau des centromères des chromosomes. Ces sondes sont surtout utiles pour dénombrer les chromosomes, aussi bien en métaphase qu'en interphase.

Les sondes LSI (Locus Specific Identifier) du *SRY* :

Pour être bien détectée, cette sonde doit avoir une taille >25kb et recouvrir plus de 50% de sa cible. L'utilisation de la sonde LSI du *SRY* est associée à la sonde CEP du ch Y afin d'être sûr que l'hybridation a eu lieu.

5– Visualisation et analyse des hybrides

Grâce à un microscope qui émet un faisceau lumineux excitant le Fluorochrome, on peut visualiser des loci sur des métaphases ou des noyaux, d'où le terme *in situ*.

L'utilisation de plusieurs fluorochromes et de filtres microscopiques ainsi que le développement de système de numérisation des signaux fluorescents ont permis d'hybrider plusieurs sondes de façon concomitante.

6– Nomenclature internationale selon the International System for human Cytogenetic Nomenclature « ISCN »

Quelques exemples :

- Quand le caryotype a été fait, .ish suit la formule.
- Quand il y a plusieurs anomalies, la formule FISH est tout à la fin après le nombre de mitoses étudiés et non plus après l'anomalie étudiée.
- Si le caryotype n'a pas été fait, on écrit directement ish.
- Quand la FISH est faite sur les noyaux, on met nuc devant ish.
- Quand la FISH est faite sur métaphases et noyaux, les 2 formules doivent être écrites sur des lignes différentes :

46,XX.ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[5]

nuc ish(TUPLE1×1)(ARSA×2)[50]

III– Recherche de la micro délétion du chromosome Y

Elle a été réalisée par le kit « Y Chromosome AZF Analysis System » de PROMEGA®

1 – Préparation de la réaction

Les aliquotes d'ADN des patients sont placés dans un tube à réaction. Séparément, la Taq DNA polymérase est ajoutée à chacun des 5 Multiplex Master Mixes. Ensuite, le Multiplex Master Mix contenant la Taq DNA polymérase est ajoutée aux tubes contenant l'ADN échantillon. Chaque échantillon d'ADN est analysé à l'aide de chacun des Multiplex Master Mixes.

1. Décongeler les Multiplex Master Mixes, la Nuclease-Free Water et le Male Genomic DNA dans la glace. Une fois décongelés, les conserver dans la glace.
2. Vortexer les Multiplex Master Mixes pendant 5 à 10 secondes avant emploi.
3. Préparer et étiqueter le nombre requis de tubes comme spécifié ci-dessus.

Utiliser des tubes d'amplification à paroi fine. Placer les tubes dans de la glace.

4. Dans un tube à part, diluer chaque ADN échantillon à 10 ng/ μ l à l'aide de la Nuclease-Free Water fournie. Bien mélanger en vortexant pendant 5 à 10 secondes.

Ajouter 5 μ l d'ADN dilué aux tubes correctement étiquetés sur glace.

Échantillon d'ADN contrôle positif : Pour l'échantillon Male Genomic DNA contrôle positif, diluer le Male Genomic DNA à 10 ng/ μ l en ajoutant 6 μ l de Male Genomic DNA à 24 μ l de Nuclease-Free Water. Bien mélanger en vortexant pendant 5 à 10 secondes. Ajouter 5 μ l aux tubes correctement étiquetés sur glace.

Échantillon sans ADN contrôle négatif : Pour le contrôle négatif (sans ADN), ajouter 5 μ l de Nuclease-Free Water aux tubes correctement étiquetés sur glace.

5. Préparer cinq mélanges de Multiplex Master Mix/GoTaq® DNA polymérase sur glace, à raison d'un mélange par Multiplex Master Mix. Vortexer les Multiplex Master Mixes avant de les utiliser.
6. Vortexer pour mélanger.

7. Ajouter 20 µl du mélange de Multiplex Master Mix/GoTaq® DNA polymérase aux tubes appropriés contenant l'ADN échantillon ou les contrôles, et ceci sur la glace.
8. Vortexer délicatement pour mélanger.
9. Centrifuger les tubes brièvement pour faire descendre le contenu au fond des tubes. Placer les tubes sur la glace jusqu'à ce que vous soyez prêt à effectuer le cycle thermique.
10. Les thermocycleurs sans couvercles chauffés (par exemple, le Perkin-Elmer Model 480 thermal cycler) ont besoin d'une couche d'huile minérale sur les réactions en tube. Incliner les tubes et ajouter une goutte d'huile sur le côté du tube, en laissant l'huile couler le long du tube.

2- Protocole optimal de cycles thermiques de PCR pour le thermocycleur (figure 17)

94 °C pendant 2 minutes, puis :

35 cycles. Pour chaque cycle : 94°C pendant 1 minute → 57°C, pendant 30 secondes → 72°C pendant 1 minute, puis :

72 °C pendant 5 minutes → Trempage à 4 °C



Figure 17 : Thermocycleurs pour PCR de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès

3– Électrophorèse sur gel d'agarose

4 % de NuSieve® à 3:1 plus des minigels Reliant® prémoulés de tampon TBE (Cambrex référence 54927, 54928 ou 54929) sont requis pour l'électrophorèse et une visualisation ultérieure optimale des produits d'amplification.

1. Diluer le marqueur de poids moléculaire de la manière suivante :

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

2. Ajouter 2,5 µl de Blue/Orange 6X Loading Dye à chaque tube d'amplification et mélanger.

3. Charger le premier puits du gel avec 10 µl de marqueur de poids moléculaire dilué.

4. Charger chaque puits avec 10 µl de chaque échantillon.

5. Charger le dernier puits du gel avec 10 µl de marqueur de poids moléculaire dilué.

6. Faire migrer le gel dans du tampon TBE 1X contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium à une vitesse de 5V/cm (mesuré comme la distance entre les électrodes) jusqu'à ce que le front avant du bleu de bromophénol migre jusqu'à l'autre extrémité du gel (Figure 18).

7. Photographier le gel à l'aide du transilluminateur UV (320 nm).



Figure 18 : dispositif de migration des produits de PCR et photographie des bandes par le transilluminateur à rayons ultra-violet à l'unité de génétique

4- Analyse des données—Contrôles

Déterminer si les réactions de contrôle ont produit les résultats anticipés avant d'analyser vos échantillons.

a- Contrôle négatif sans ADN :

Il ne doit y avoir aucuns produits d'amplification spécifique dans les puits contenant les réactions de contrôles sans ADN négatifs. Des bandes de faible poids moléculaire ou des traînées (smears) résultant d'interactions d'amorces peuvent apparaître. Les résultats ne doivent pas être considérés valables si des produits d'amplification sont observés dans les réactions du contrôle négatif sans ADN. Ceci est indicateur de la présence d'ADN contaminant, et l'expérience doit être répétée avec soin pour éviter toute contamination.

b- Contrôle d'ADN génomique mâle positif :

Le nombre et la taille des produits d'amplification pour chaque Multiplex Master Mix est indiqué dans la figure 19.

Multiplex A Master Mix			
STS	Locus	Taille du Produit (bp)	Position sur carte
SY254	DAZ	380	18
SY157	DYS240	290	20
SY81	DYS271	209	2
SY130	DYS221	173	11
SY182	KAL-Y	125	5
	SMCX	83	Contrôle

Multiplex B Master Mix			
STS	Locus	Taille du Produit (bp)	Position sur carte
SYPR3	SMCY	362	7
SY127	DYS218	274	9
SY242	DAZ	233	16
SY208	DAZ	140	17
	SMCX	83	Contrôle

Multiplex C Master Mix			
STS	Locus	Taille du Produit (bp)	Position sur carte
SY128	DYS219	228	10
SY121	DYS212	190	6
SY145	DYF51S1	143	14
SY255	DAZ	124	19
	SMCX	83	Contrôle

Multiplex D Master Mix			
STS	Locus	Taille du Produit (bp)	Position sur carte
SY133	DYS223	177	12
SY152	DYS236	125	15
SY124	DYS215	109	8
	SMCX	83	Contrôle

Multiplex E Master Mix			
STS	Locus	Taille du Produit (bp)	Position sur carte
	ZFX/ZFY	496	Contrôle
SY14	SRY	400	1
SY134	DYS224	303	13
SY86	DYS148	232	3
SY84	DYS273	177	4

Figure 19 : liste des différents loci explorés par le kit « Y Chromosome AZF Analysis System » de PROMEGA®

La réaction du contrôle positif Male Genomic DNA pour chaque Multiplex Master Mix doit comporter toutes les bandes indiquées pour ce Multiplex Master Mix. Les tailles des produits d'amplification peuvent être estimées par comparaison avec le marqueur de poids moléculaire de 50bp DNA Step Ladder ayant migré sur le gel. Si toutes les bandes anticipées ne sont pas présentes dans les réactions avec le contrôle positif Male Genomic DNA, ou s'il existe des bandes supplémentaires proéminentes, ceci est indicateur d'un problème lié aux réactifs d'amplification ou au thermocycleur. Les résultats ne doivent pas être considérés valables si tout produit d'amplification manque dans les réactions au contrôle positif Male Genomic DNA.

c-Amorce de contrôle dans les Multiplex Master Mixes :

Dans les réactions Multiplex A, B, C et D Master Mix, le plus petit produit d'amplification (83 bp) doit être produit à partir d'un locus lié à X (SMCX). Dans le Multiplex E Master Mix, le plus grand produit d'amplification (496 bp) doit être engendré par les gènes ZFY/ZFX. L'absence de ces produits est indicatrice d'un problème avec cette amplification par PCR multiplex en question. Si ces bandes de contrôle sont présentes avec le contrôle positif Male Genomic DNA mais pas avec l'ADN échantillon, ceci suggère qu'il peut y avoir un problème avec l'ADN génomique utilisé comme matrice. Les problèmes avec l'ADN échantillon peuvent relever de : la présence d'impuretés, une quantification de l'ADN inexacte ou d'une dégradation de l'ADN. Vérifier la matrice ADN sur un gel d'agarose avant d'effectuer une nouvelle amplification. Effectuer de nouvelles amplifications à partir de n'importe quelles réactions d'ADN échantillon exemptes de produit de contrôle. Il peut être nécessaire d'isoler à nouveau l'ADN génomique matrice.

Toutes les délétions doivent être contiguës. Si de multiples bandes d'amplification manquent pour un échantillon, et que ces bandes ne correspondent pas à des régions adjacentes sur le chromosome Y, elles représentent la perte de bandes, mais ce ne sont pas des délétions. Dans ce cas, il convient de répéter le test. Si une seule bande d'amplification manque dans un échantillon, elle peut représenter la perte d'une bande ; il convient alors de répéter le test afin de confirmer que le locus n'amplifie pas. Veuillez noter qu'un locus présent dans un échantillon peut ne pas amplifier en cas de mutation dans l'un des sites de liaison de l'amorce pour le locus. Les résultats diagnostiques obtenus avec ce système doivent uniquement être interprétés à la lumière des autres données cliniques ou de laboratoire disponibles.

IV- Recherche de la mutation du gène AURKC

1 – Prélèvement :

On prélève dans un tube EDTA de 5 ml de sang, pour l'extraction d'ADN par kit.

2 – Techniques de préparation et de purification des acides nucléiques

L'extraction de l'ADN est une technique qui isole de l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse. Nous l'avons effectué par KIT commercialisé (invitrogen).

a- Principe :

Après digestion enzymatique et solubilisation des lipides dans une solution spécifique, l'ADN chargé négativement est mis en contact avec des billes magnétiques chargées positivement afin qu'il s'accroche à celles-ci. La solution est éliminée alors que les billes sont maintenues à l'aide d'un aimant. Une autre solution de composition différente est ensuite ajoutée aux billes afin de neutraliser leur charge. L'ADN est alors libéré dans cette seconde solution.

b- Protocole expérimental :

Pour 2 ml des échantillons de sang, nous employons les volumes de réactif indiqués pour 3 ml des échantillons de sang.

1. Vortexer le tube contenant les billes Magnétiques GeneCatcher™ pour resuspendre et distribuer les billes dans le tampon de stockage.
2. Ajouter les billes Magnétiques re suspendues et le tampon de Lysis à un tube 50 ml stérile. Mélangez les billes en tourbillonnant doucement le tube jusqu'à ce que les billes soient distribuées.
3. Ajouter 2-10 ml du sang bien mélangé au tube contenant les billes et inversez doucement le tube étonné 3 fois pour mélanger les billes.
4. Incuber à la température ambiante pendant 5 minutes pour permettre à l'ADN de se lier aux billes. Pendant l'incubation, agiter doucement le tube de temps en temps.
5. Placer le tube de 50 ml sur le Support de Séparateur Magnétique pendant 3 minutes.
6. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, éliminer soigneusement le surnageant en utilisation une pipette de 5 ml sans toucher les billes.
7. Enlever le tube du Séparateur Magnétique.
8. Ajouter 5 ml du tampon de Lysis au tube sans tenir compte du volume du sang et inversez doucement le tube 3 fois pour mélanger les billes et enlever les contaminations résiduelles par lavage.
9. Incuber à la température ambiante pendant 30 secondes.
10. Placer le tube sur le Séparateur Magnétique pendant 20 secondes.
11. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, éliminer le surnageant en utilisation une pipette de 5 ml sans toucher les billes.
12. Passer immédiatement à la Digestion par la Protéase.

Digestion par la Protéase

1. Mettre le bain marie à 65°C.
2. Enlever le tube contenant les billes magnétiques du Séparateur Magnétique
3. Ajouter le tampon de Protéase et la Protéase au tube et vortexer le tube pour disperser les billes (30 secondes).
4. Incuber le tube à 65°C pendant 10 minutes et incuber ensuite à température ambiante (10–20 minutes).
5. Inversez doucement le tube deux fois pour resuspendre billes.
6. Passer immédiatement au lavage d'ADN.

Lavage d'ADN

1. Ajouter l'isopropanol (IPA) 100 % au tube et mélanger en inversant doucement le tube jusqu'à l'apparition d'une forme d'agrégation visible. Note : L'absence d'agrégation après 2–3 minutes indique un très faible taux d'ADN dans l'échantillon.
2. Placer l'échantillon sur le Séparateur Magnétique pendant 30 secondes à 1 minute.
3. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, éliminer le surnageant en utilisant une pipette de 5 ml sans toucher les billes.
4. Enlever le tube du Séparateur Magnétique.
5. Ajouter 3 ml 50 % (v/v) d'isopropanol sans tenir compte du volume de sang au tube et le mélanger en inversant doucement le tube 5 fois.
6. Placer l'échantillon sur le Séparateur Magnétique pendant 30 secondes.
7. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, éliminer le surnageant en utilisant une pipette de 5 ml sans toucher les billes.

8. Garder le tube sur le Séparateur Magnétique pendant une minute pour permettre au reste du liquide d'arranger au fond du tube. Eliminer le surnageant en utilisant une pipette de 1 ml.
9. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, ajoutez 250 μ l du tampon Lavant (sans tenir compte du volume de sang) en face de la boulette de billes.
10. Incuber pendant 1 minute à température ambiante.
11. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, éliminer le surnageant en utilisant une pipette de 1ml sans toucher les billes.
12. Répéter des étapes 9–11.
13. Passer immédiatement à l'élution d'ADN.

L'élution d'ADN

1. Mettre le bain marie à 65°C.
2. Enlever le tube contenant les billes magnétiques du Séparateur Magnétique.
3. Ajouter 1 ml du tampon d'Elution (E5), sans tenir compte du volume de sang, au tube et agitent doucement l'échantillon en tourbillonnant le tube pour sortir la boulette de bille. Pour les échantillons avec haut contenu d'ADN
4. Incuber à 65°C pendant 1 heure.
5. Enlever le tube du bain marie et mixer par une pipette de 800 μ l, pour disperser la boulette complètement. Notez : Pour le haut contenu d'ADN, incubez les échantillons pendant 20 minutes complémentaires et répéter l'étape 5.
6. Placer le tube sur le Séparateur Magnétique avant que le surnageant ne soit clair et sans couleur (d'habitude 15 minutes à 1 heure, les échantillons visqueux exigent plus de temps).
7. Sans enlever le tube du Séparateur Magnétique, enlever soigneusement le surnageant contenant l'ADN en employant la pipette 1 ml sans toucher la boulette de billes et transférer le surnageant à un tube stérile.

8. éliminer les billes magnétiques employées. Le stockage de l'ADN
9. Stocker l'ADN épuré à -20°C ou employer l'ADN pour les applications désirable en aval.
10. Pour éviter la congélation répétée d'ADN, stockez l'ADN épuré à 4°C pour l'utilisation immédiate ou l'aliquoter et le stocker à -20°C .

3- Dosage de l'ADN :

La concentration en ADN de l'échantillon est estimée par spectrophotométrie. En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultraviolet. Le maximum de cette absorption se situe à 260 nm. L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A_{260}/A_{280} est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8, tandis que l'ARN pur devrait avoir une valeur d'environ 2,0. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A_{260}/A_{230} devrait être d'environ 2,2. Au laboratoire, le « NANODROP » est utilisé pour réaliser le dosage. Il suffit de déposer dans l'appareil 2 μl d'ADN extrait pour déterminer sa concentration et obtenir la courbe qui renseigne sur sa pureté.

4- Amplification des séquences nucléotidiques par PCR :

a- Principe :

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle.

Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle. Pour avoir la réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes :

(1) dénaturation de l'ADN pour obtenir des matrices simple brin.

(2) hybridation des amorces spécifiques.

(3) réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire par l'enzyme polymérase. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

b- Condition de PCR :

Pour procéder à l'amplification d'une séquence d'ADN, Les PCR ont été effectuées et optimisées sur l'ADN génomique préalablement dilué à 100 ng/ μ l en utilisant des amorces spécifiques de l'exon 3 du gène *AURKC* :

F : 5' TCCCAAGCTGAGGCTTTTTTC 3'

R : 3' TTCCTCTTTCATCTTTGACGT 5'

Les réactions PCR ont été effectuées et optimisées pour chaque région cible dans un volume final de 20 μ l pour le mélange réactionnel. Et enfin, le mélange est déposé au niveau d'un thermocycleur selon le programme suivant :

95 °C pendant 2 minutes, puis :

35 cycles. Pour chaque cycle : 94°C pendant 1 minute → 57°C, pendant 30 secondes → 72°C pendant 1 minute, puis :

72 °C pendant 5 minutes → Trempage à 4 °C

c- Témoins de la réaction PCR :

Les témoins inclus pour chaque réaction PCR comprennent : – Témoins positif qui a pour fonction de s'assurer des bonnes conditions de la PCR, ce témoin est représenté par l'ADN d'un sujet normal sain. – Témoin négatif qui permet de s'assurer de l'absence de contamination, auquel il n'y a pas d'ADN.

d- Contrôle des produits PCR :

Les produits PCR sont contrôlés sur gel d'agarose 2 % en présence d'un marqueur de taille, qui permet de vérifier la taille et la spécificité du produit amplifié.

5- Séquençages d'ADN :

Avant de séquencer nos produits PCR, il faudra les purifier pour éliminer l'excès d'amorces, dNTP et d'ADN polymérase, pour cela il 3 réactions essentielles comme suit :

a- Purification par ExoSAP® :

ExoSAP-IT est conçu pour une purification rapide et efficace des produits de PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase (Exo) qui dégrade les ADN simples brins et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui hydrolyse les dNTPs libres, et en excès sans interférence avec les applications en aval. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Les fragments simples brins inférieurs à 100 pb sont ainsi dégradés. On utilise 8 µl de l'enzyme ExoSAP avec 10 µl du produit PCR. On le place au niveau du thermocycleur suivant le cycle suivant :

Température	Durée
37°C	3 mn
80 °C	15 min
10°C	∞

b- Reaction de sequence par BigDye® Terminator v 3. 1 Cycle Sequencing :

Selon la réaction de Sanger qui repose sur l'incorporation aléatoire de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel dont chacun est marqué par un fluorophore dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes, associer la base correspondante et donc définir la séquence

nucléotidique du brin d'ADN initial. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal. On les appelle des terminateurs d'élongation ou "BigDyeTerminators" ou "Dye-labeledterminator". Nous utilisons la technologie BigDyeTerminator_version 2 (AppliedBiosystems : ABI). La technologie BigDye Terminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (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 ddNTP. 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 à 488 nm et 514,5 nm. Son énergie de fluorescence émise (515–520 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.

Le spectre de la fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la dRhodamine permet une amplification du signal et par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique.

On effectue 30 cycles d'amplification sur le thermocycleur dans des conditions spécifiques à la réaction de séquence. Un cycle correspond à : Une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10 secondes pour obtenir l'ADN sous forme simple brin. Une étape d'hybridation à 50°C pendant 5 secondes (température moyenne d'hybridation pour la majorité des amorces utilisées). Une étape d'élongation de l'ADN par la Taq polymérase à 60°C pendant 4 minutes. Cette température faible ralentit la Taq et va déplacer l'équilibre pour permettre une meilleure incorporation des ddNTP. Une fois l'étape de thermocyclage effectuée, il est nécessaire de purifier la réaction de séquence.

c- Purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye-XTerminator :

Le kit BigDye® Xterminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les dyes non incorporés dans la réaction, les sels et autres molécules chargées qui pourraient interférer lors de la détection des bases par électrophorèse capillaire. Le kit contient :

- un flacon —SAM Solution|| (stockage à T° ambiante)
- un flacon : « XTerminator Solution (stockage à 4°C, ne pas congeler)

1. Déposer 10µl de produits de réaction de séquence dans la plaque Applied.
2. Centrifuger la plaque.
3. Préparer un mix contenant : 45 µl de solution SAM par puits 10 µl de XTerminator Solution par puits à l'aide des cônes spécifiques. – Vortexer 10 sec le flacon XTerminator Solution et prélever immédiatement la quantité nécessaire.
4. Vortexer le mélange et ajouter 55µl dans chaque puits à l'aide de la pipette distritips ou de la pipette monocanal.
5. Sceller la plaque correctement avec un film adhésif
6. Mettre la plaque sur l'agitateur Eppendorf Mix Mate.
7. Lancer l'agitateur sur la position 1800 rpm pendant 30 secondes et vérifiez que tout se mélange bien et que la plaque reste bien attachée.
8. Agiter à 1800 rpm pendant 30 minutes.
9. Centrifuger la plaque 2 minutes à 1000 g (Centrifugeuse HeraeusMultifuge 3S-R).
Les plaques peuvent être conservées 7 jours à 4°C (pas congelées) avant d'être analysées par le séquenceur.

d- Détermination de la séquence :

La plaque est placée dans le séquenceur qui est un automate d'électrophorèse capillaire. Ce dernier lance un flux électrique d'ions à travers un capillaire, ce qui entraîne la migration des fragments d'ADN. Une fois arrivés au site de détection, les quatre fluorochromes des ddNTP terminaux seront excités. Suite à cette excitation, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera

détectée puis convertie en séquence par le logiciel d'analyse des séquences. Les séquences d'ADN sont déterminées par séquençage automatique (séquenceur à 8 capillaires appliedbiosystem 3500 DX) (Figure 21).

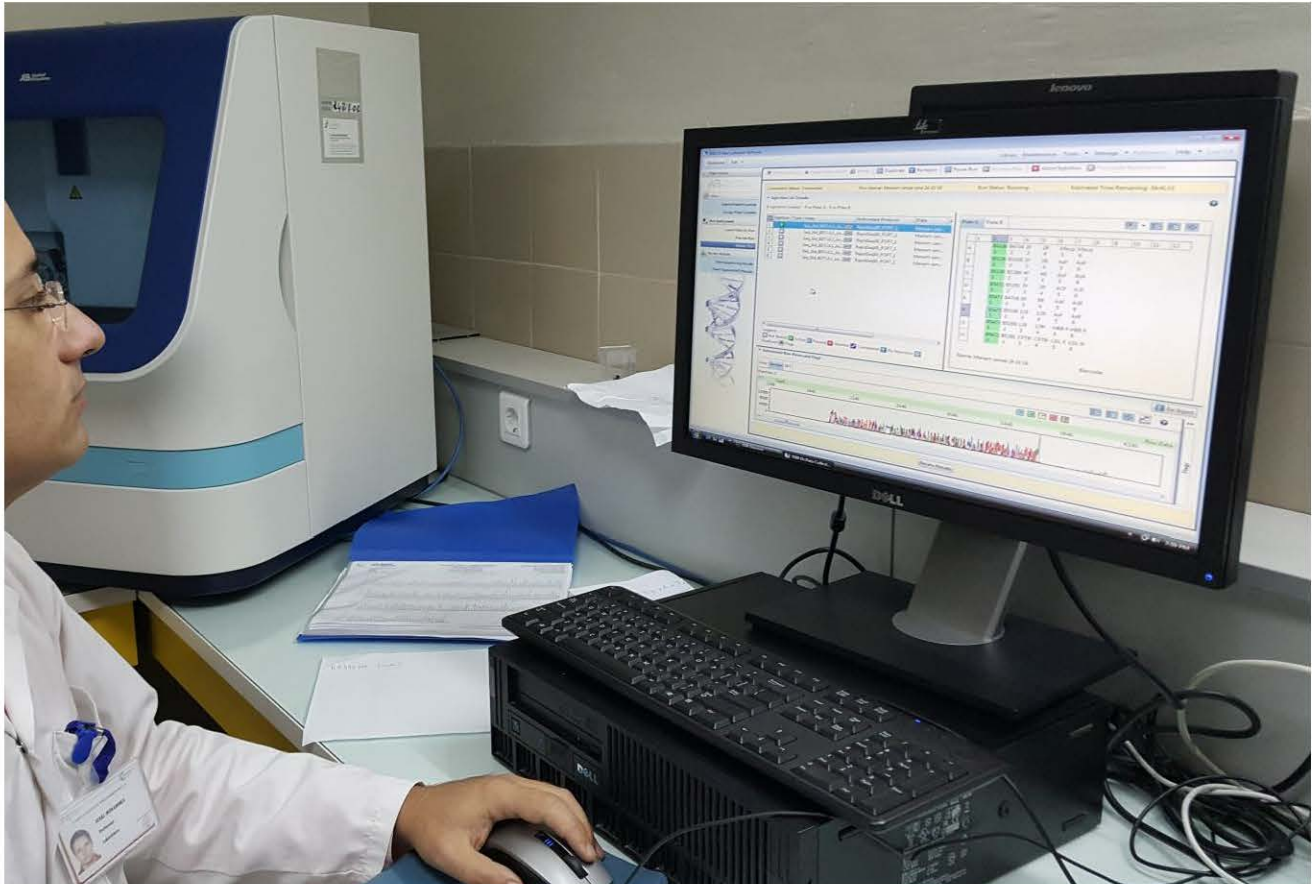


Figure 21 : Analyse de l'exon 3 du gène *AURKC* par le séquenceur 3500 DX (Applied biosystem) à l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès.

RESULTATS

I-Description épidémiologique globale

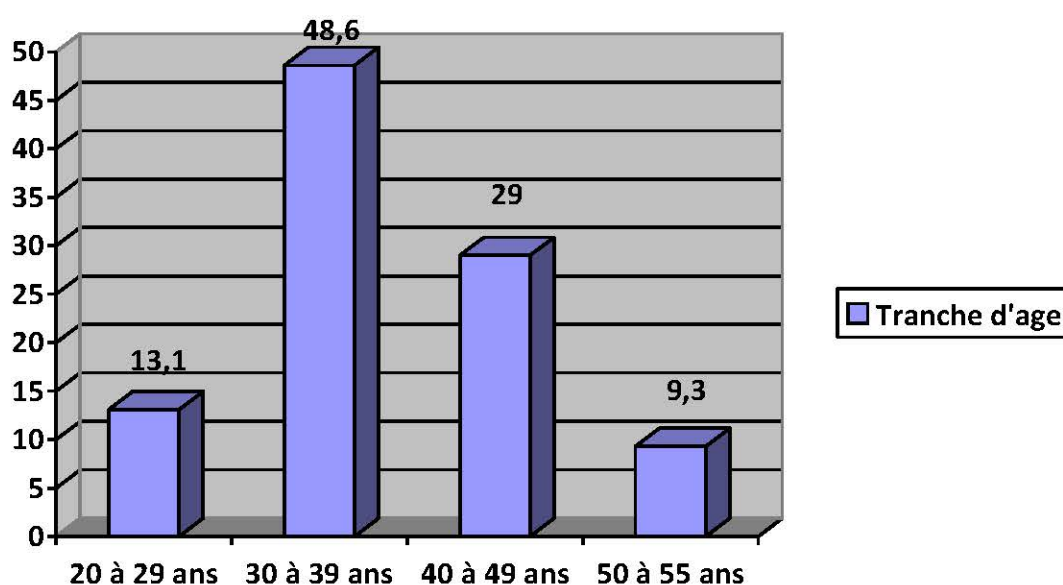
118 patients ont été adressés à l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès. Parmi eux, 117 patients ont bénéficié de tests génétiques. Nous avons refusé tout test pour un seul patient, car il nous a été adressé pour azoospermie et chez qui la recherche de spermatozoïdes dans les urines a objectivée une éjaculation rétrograde expliquée par un diabète de type 1.

1- Répartition selon l'âge :

Parmi les 117 patients, L'âge a été rapporté chez 107 d'entre eux. L'âge médian est de 37 ans, avec un âge minimal de 20 ans et un âge maximal à la consultation de 55 ans.

L'âge moyen à la consultation génétique est de 38,04 années, avec un écart type de 7,45 années.

La majorité des patients consultent pendant la 4^{ème} et la 5^{ème} décade (Graphique 1).



Graphique 1 : Répartition selon la tranche d'âge

2- La Répartition selon de type d'infertilité

Sels 2 patients ont consulté ont consulté pour une infertilité secondaire ce qui signifie que l'infertilité masculine est majoritairement primaire avec 98% des cas.

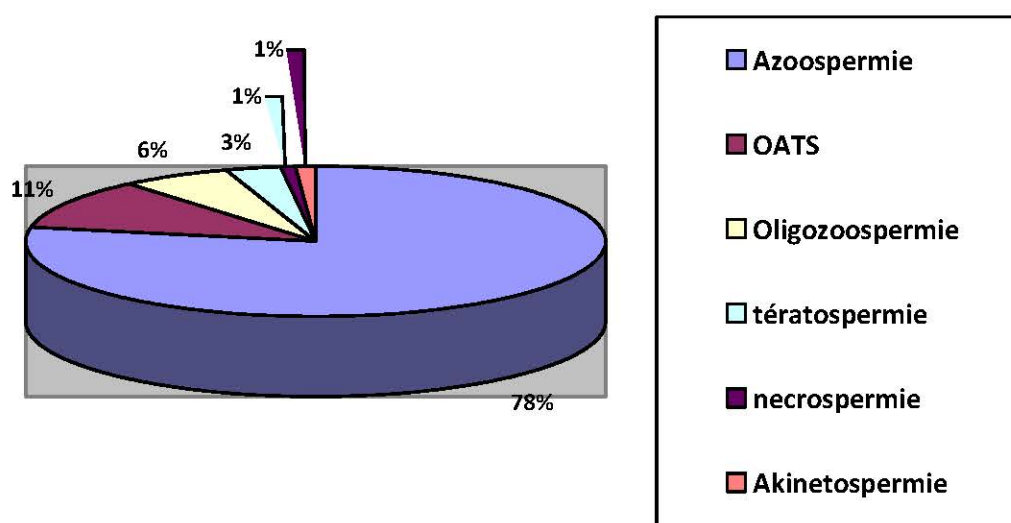
3- La Répartition selon la durée de l'infertilité

Elle a pu être évaluée chez 76 patients. La durée moyenne est de 6,6 +/- 4,7 années. La médiane est de 5 ans, avec une durée minimale d'une année, ce qui est conforme avec la définition de l'OMS.

25% des patients n'ont bénéficié de leur première consultation en génétique médicale que plus de 8 ans après leur mariage, avec une durée maximale de 23 ans.

4- La répartition selon le résultat du spermogramme

L'altération spermatique la plus fréquente chez les patients infertiles consultant en génétique est l'azoospermie avec 78,6%. Elle est suivi par l'oligothéno-teratospermie avec 11,1% des cas (Graphique 2).



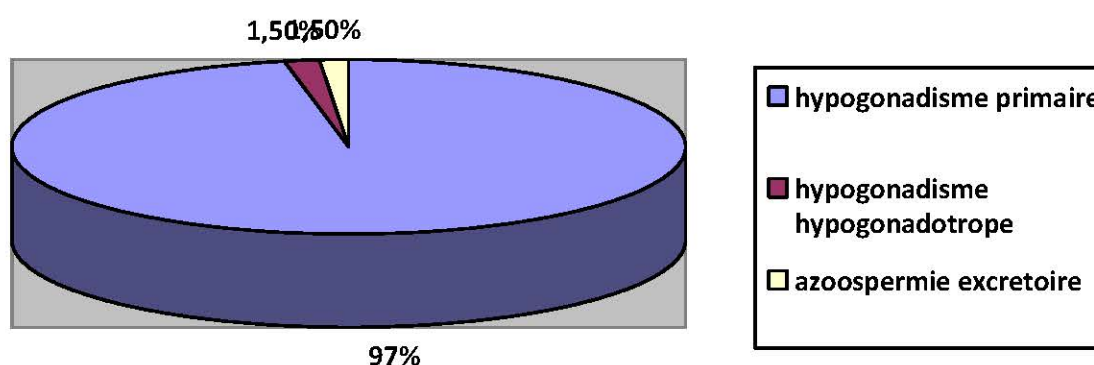
Graphique 2 : Répartition des patients selon le résultat du spermogramme

5- La Répartition selon le mécanisme de l'infertilité

Le mécanisme de l'infertilité a été précisé chez 63 patients.

Un seul patient présentait une azoospermie excrétoire. Il était âgé de 37 ans, avec une infertilité primaire de 4 ans, avec des antécédents d'infections sexuellement transmissibles. L'échographie a objectivé une dilatation bilatérale des canaux déférents avec de grosses calcifications épidydimaires.

Parmi les 62 autres patients, un seul âgé de 30 ans a consulté pour une infertilité primaire avec azoospermie et un bilan hormonal objectivant un hypogonadisme hypo gonadotrope et une IRM cérébrale sans anomalie (Graphique 3).



Graphique 3 : Répartition selon le mécanisme de l'infertilité

II- Les Résultats des Tests génétiques réalisés

1- La Répartition selon le résultat du caryotype

Parmi les 117 patients explorés, 114 patients infertiles ont bénéficié du caryotype sur lymphocytes sanguins.

81,6% de nos patients ont une formule chromosomique normale 46,XY ; et 18,4% de nos patients ont un syndrome de klinefelter soit 21 patients. Parmi ces patients klinefelteriens 85% ont une forme homogène (Figure 22).

92 patients azoospermiques ont bénéficié d'un caryotype. 23% d'entre eux ont un syndrome de klinefelter.

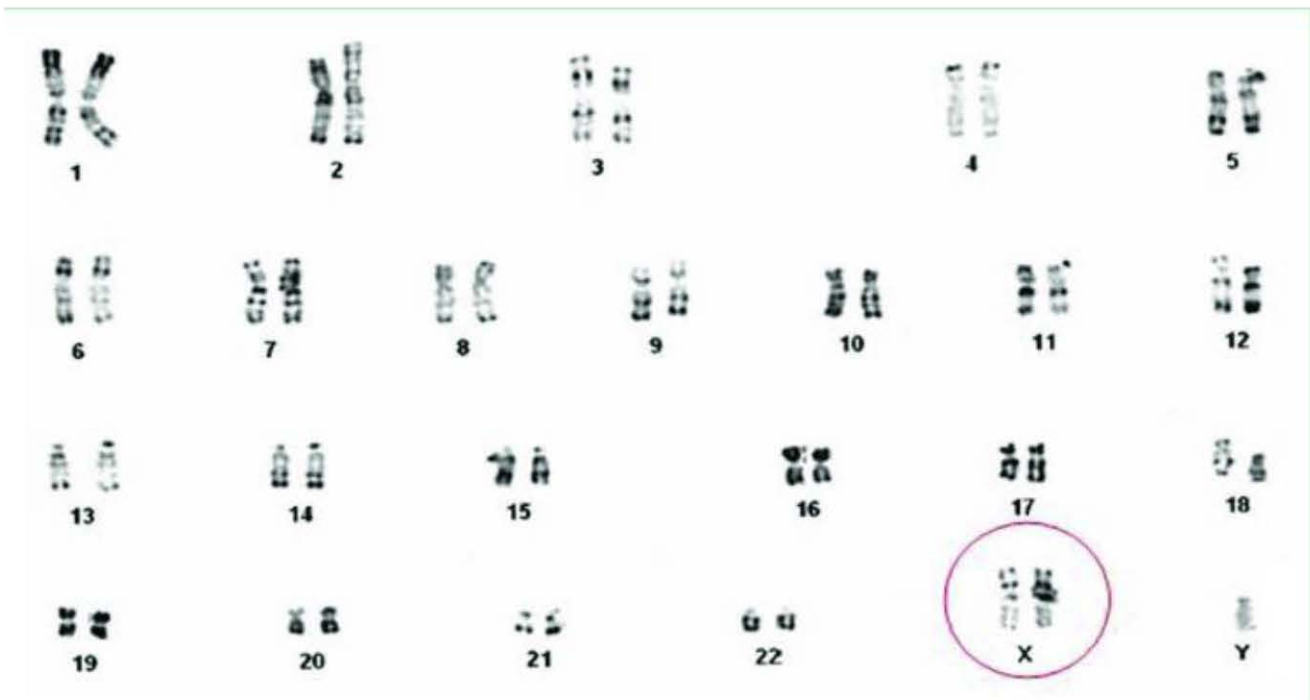
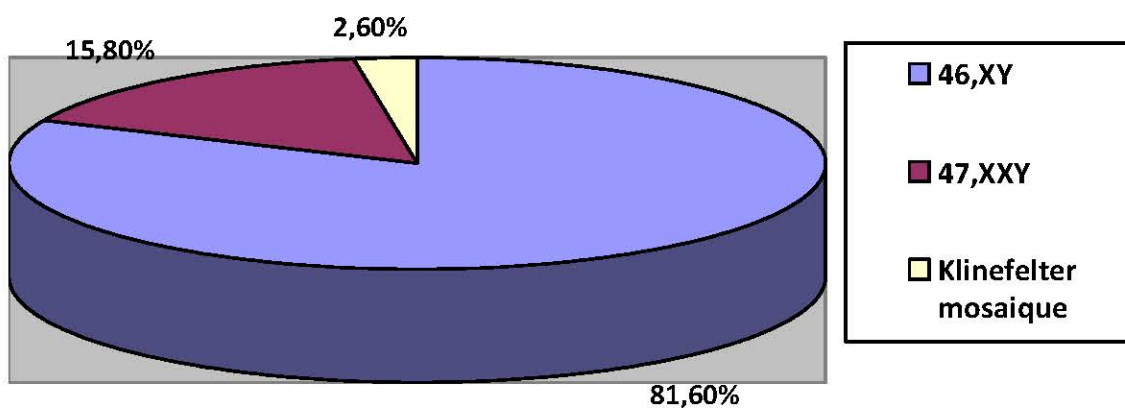


Figure 22 : Caryotype d'un patient klinefelterien présentant une azoospermie sécrétoire (unité de génétique, CHU Hassan II).

Un patient a une formule chromosomique 47,XXY/46,XY. un autre a une formule 47,XXY/46,XY/45,X et un dernier avec une formule 47,XXY/46,XX (graphique 4).



Graphique 4 : Répartition selon les résultats du caryotype

2- Les résultats de la FISH

Les patients klinefelteriens en mosaïque ont bénéficié d'une confirmation par la technique d'hybridation in situ fluorescente utilisant les sondes centromériques des chromosomes X et Y (Figure 23).

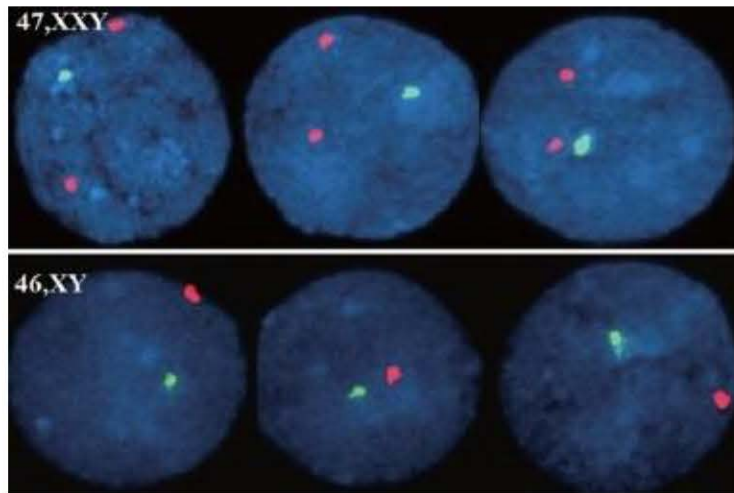


Figure 23 : Aspect en FISH sur noyaux interphasiques d'un patient présentant un syndrome de Klinefelter en mosaïque 47XXY/46XY : sonde CEP X marqué en rouge, sonde CEP Y marqué en vert.

A noter que chez un patient âgé de 38 ans, ayant présenté une infertilité primaire d'une année avec hypotrophie testiculaire bilatérale, une gynécomastie bilatérale, un micro pénis, une hypo pilosité et une petite taille, le spermogramme a révélé une azoospermie sécrétoire. Le bilan hormonal a montré un hypogonadisme hyper gonadotrope. Le caryotype étant normal, une recherche d'une micro délétion du gène *SRY* a été recherchée par FISH utilisant la sonde centromérique du chromosome Y et une sonde locus spécifique du *SRY*. Cette analyse s'est révélée sans anomalie.

3– Les résultats de la recherche de la micro délétion AZF

Parmi les 91 patients ayant un caryotype 46,XY ; seuls 23 ont bénéficié d'une recherche de la micro délétion AZF. Aucun patient ne présente cette anomalie (Figure 24).

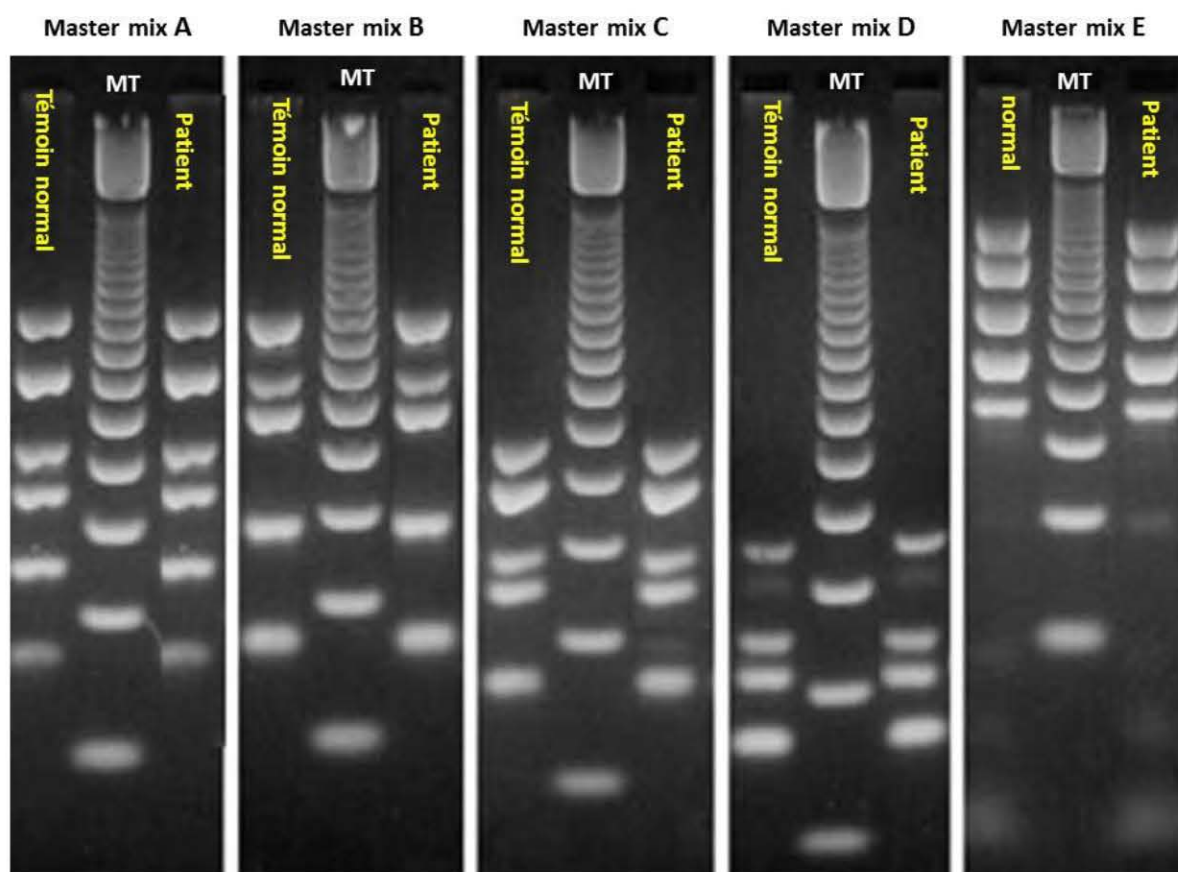


Figure 24 : résultat d'un patient azoosperme montrant l'absence de délétion des régions AZF (unité de génétique, CHU Hassan II, Fès).

4– Les résultats du Séquençage de l'exon 3 du gène *AURKC*

3 patients n'ont pas bénéficié du caryotype dans notre unité, mais d'un séquençage de l'exon 3 du gène *AURKC*. En effet, 2 d'entre eux ont été adressés pour teratzoospermie polymorphe isolée ; et un patient âgé de 35 ans adressé pour une OATS avec une majorité de spermatozoïdes macrocéphales et multi-flagellaires et présentant comme antécédent familial deux frères infertiles. Ce patient présentait une mutation homozygote c.144delC (Figure 25).

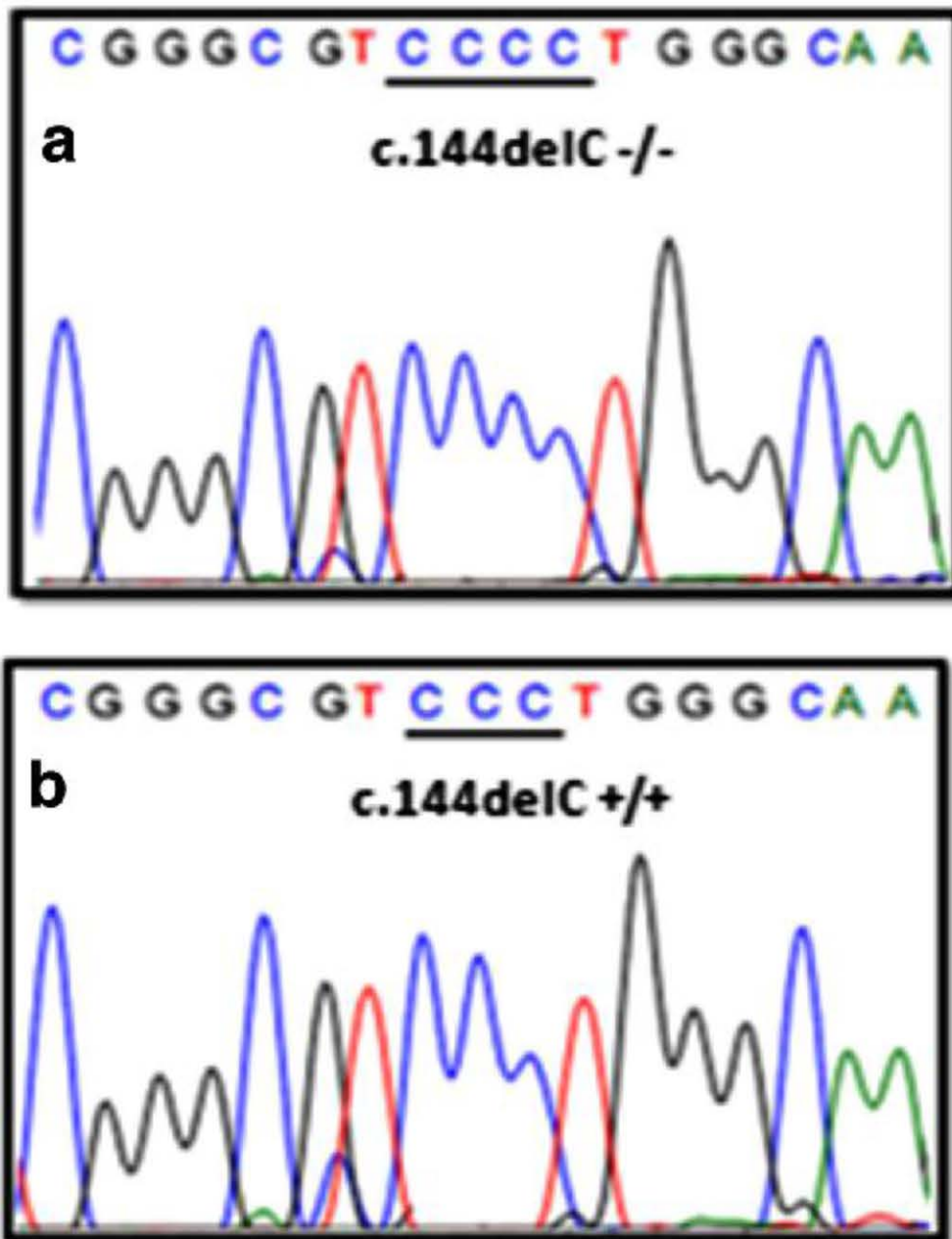


Figure 25 : Séquençage Sanger de l'exon 3 du gène *AURKC* (unité de génétique, CHU Hassan II)

A : témoin fertile.

B. Séquence du patient avec macrozoospermie montrant une mutation homozygote c.144delC

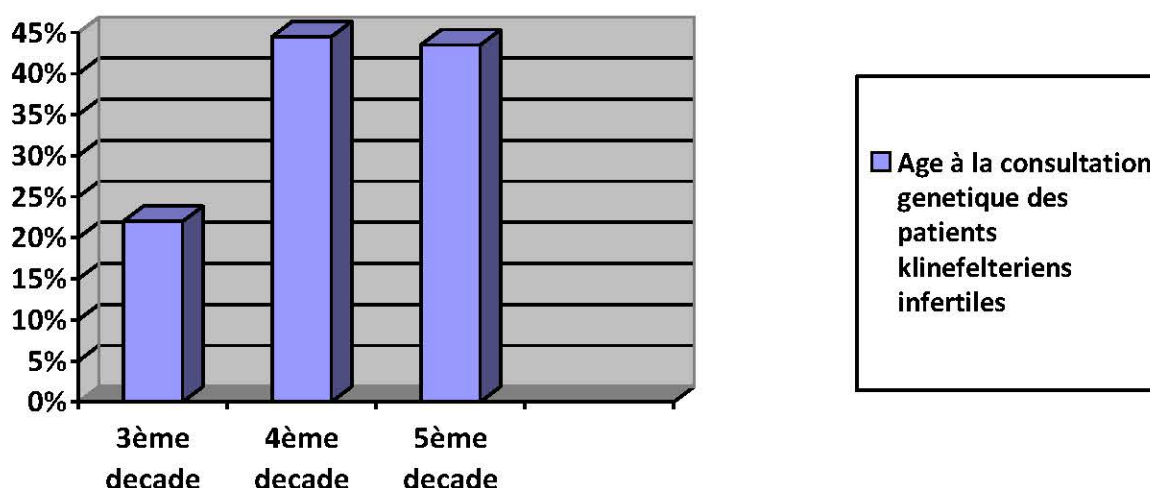
III- Les résultats spécifiques des patients avec syndrome de Klinefelter

1- La répartition selon l'âge :

Parmi les 21 patients klinefelteriens, l'âge a été rapporté chez 18 d'entre eux. L'âge médian est de 35 ans, avec un âge minimal de 27 ans et un âge maximal à la consultation de 51 ans.

L'âge moyen à la consultation génétique est de 36,9 années, avec un écart type de 8 ans.

La majorité des patients consultent pendant la 4^{ème} et la 5^{ème} décade (Graphique 5).



Graphique 5 : répartition selon la tranche d'âge

2- La répartition selon la durée de l'infertilité

Elle a pu être évaluée chez 11 patients. La durée moyenne est de 5,4 +/- 3,2 années. La médiane est de 4 ans, avec une durée minimale de 2 ans et une durée maximale de 12 ans.

3- Les résultats du spermogramme

Tous les patients présentaient une azoospermie.

4- L'estimation du volume testiculaire

Elle a été rapportée cliniquement et/ou par échographie chez 13 patients. L'hypotrophie testiculaire bilatérale a été retrouvée chez tous les klinefelteriens explorés.

5- La Présence d'une gynécomastie

Elle a été retrouvée chez 15,4% des patients (n =13).

6- La Présence d'une macroskélie

38,5 % des patients ont une grande taille par rapport à la fratrie (n=13).

7- La Présence d'une Cryptorchidie

Elle a été retrouvée chez 7,7 % des patients (n =13).

8- La Présence d'un micro pénis

Il a été retrouvé chez 15,4 % des patients (n =13).

9- La Présence d'une dysfonction érectile

Elle a été retrouvée chez 23 % des patients (n =13).

10- La Présence d'une baisse de la libido

Elle a été retrouvée chez 31% des patients (n =13).

11- La Présence d'une hypo-pilosité

Elle a été retrouvée chez 31% des patients (n =13).

12- Le Taux de testostérone sérique

50 % des patients ont une baisse du taux de testostérone contre 50 % avec taux normal (n =12).

13- Le Taux de l'hormone FSH

88 % des patients ont une hausse du taux de FSH, contre 12 % avec un taux normal (n =16).

14- La Présence associée d'une varicocèle

Une varicocèle uni ou bilatérale était associée chez 15,4 % des patients (n =13).

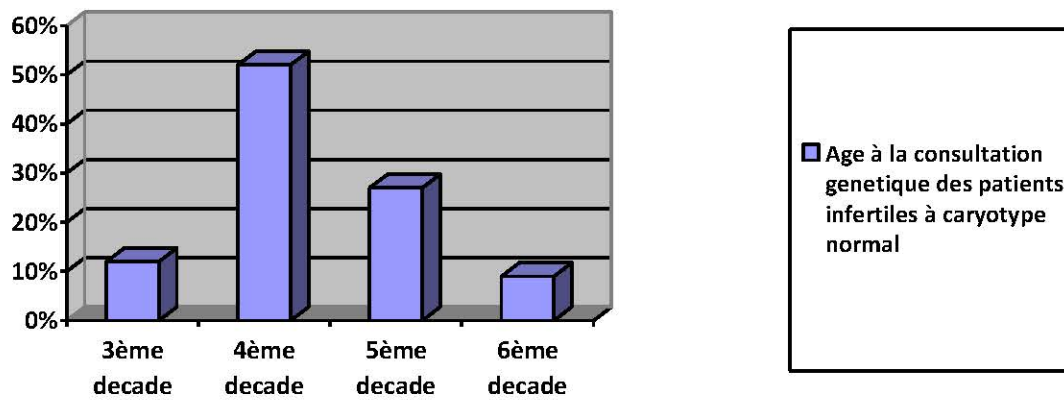
IV- Les résultats spécifiques des patients avec caryotype normal

1- La répartition selon l'âge :

Parmi les 93 patients infertiles dont le caryotype est normal (dont 23 patients ont également une absence de micro délétion AZF révélée), l'âge a été rapporté chez 85 d'entre eux. L'âge médian est de 37 ans, avec un âge minimal de 20 ans et un âge maximal à la consultation de 55 ans.

L'âge moyen à la consultation génétique est de 38,1 +/- 7,4 années.

La majorité des patients consultent pendant la 4^{ème} décade (Graphique 6).



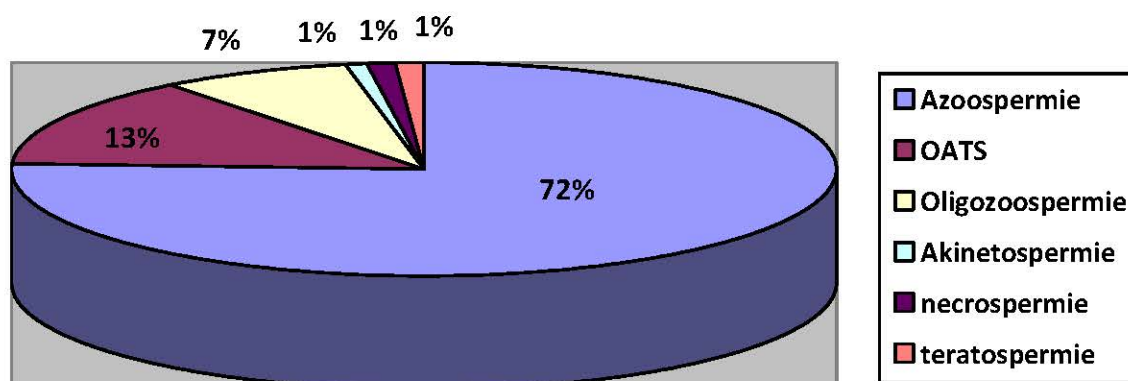
Graphique 6 : répartition selon la tranche d'âge

2- La répartition selon la durée de l'infertilité

Elle a pu être évaluée chez 62 patients. La durée moyenne de l'infertilité est de 6,9 +/- 5 années. La médiane est de 5 ans.

3- La répartition selon le Résultat du spermogramme

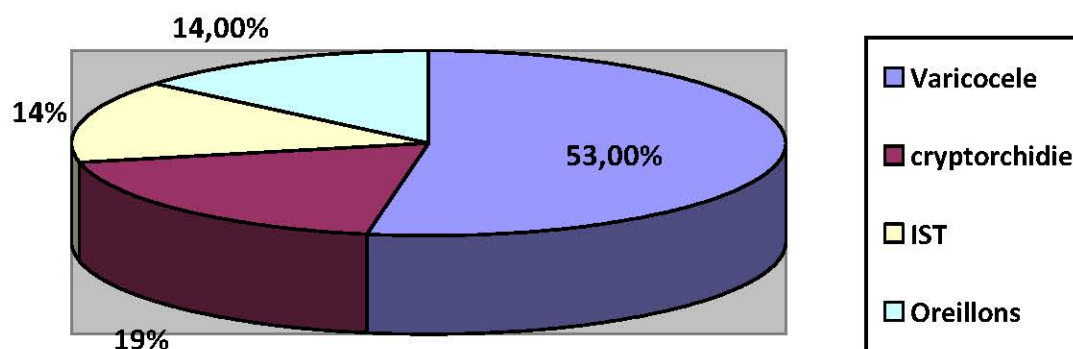
L'azoospermie est l'anomalie spermatique la plus fréquente chez les patients infertiles à caryotype normal, avec 72% des cas. Elle est suivie par l'OATS avec 13% des cas (Graphique 7).



Graphique 7 : Répartition des résultats du spermogramme chez les patients 46,XY

4- La répartition selon la présence de facteurs de risque non génétiques décrits

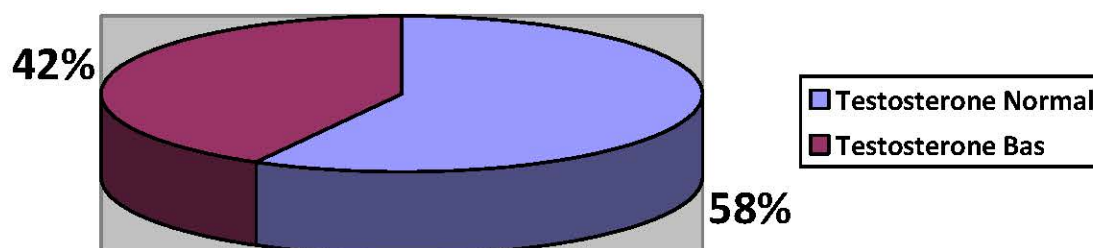
Un facteur de risque non génétique a été rapporté chez 21 patients, soit 22,6%. Ces facteurs de risque sont dominés par la varicocele avec 53% des cas (graphique 8).



Graphique 8 : Répartition des types des facteurs de risque non génétiques chez les patients 46,XY porteurs.

5- Le taux de testostérone sérique

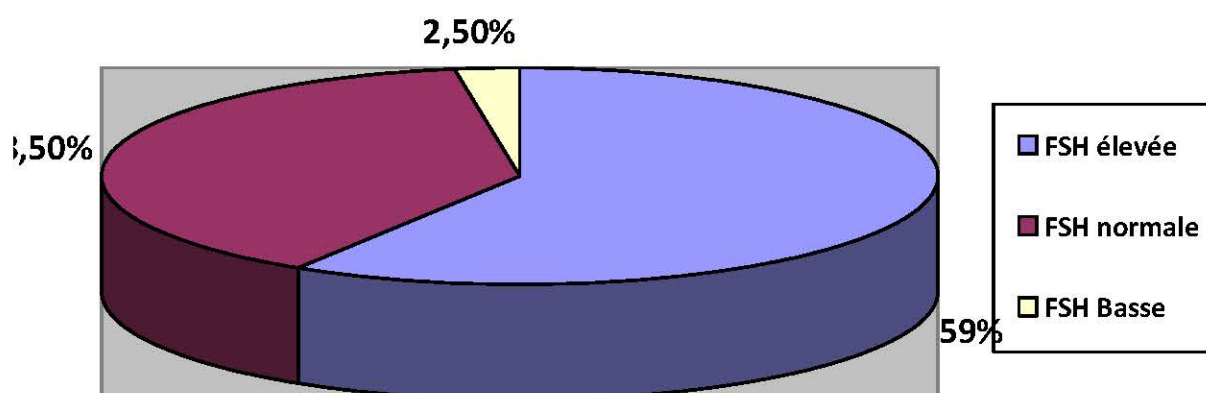
Il a été rapporté chez 33 patients (Graphique 9).



Graphique 9 : Répartition des patients infertiles 46,XY selon leur taux de testostérone

6- Le Taux de l'hormone FSH

Il a été rapporté chez 44 patients (Graphique 10).



Graphique 10 : Répartition des patients infertiles 46,XY selon leur taux de FSH

7- Des Observations particulières

Observation 1 : un patient âgé de 40 ans a consulté pour une infertilité primaire. Le spermogramme a révélé une azoospermie et l'échographie a objectivé une agénésie rénale unilatérale gauche avec hydrocèle bilatérale. Le caryotype est normal. Il n'a pas de micro délétion AZF.

Observation 2 : un patient âgé de 37 ans a consulté pour une infertilité primaire de 4 ans avec un syndrome poly-uro polydypsique. Le spermogramme a révélé une azoospermie. L'étude hormonale a retrouvé un taux de l'hormone antidiurétique diminué et des taux normaux de FSH, LH et de prolactine concluant au diagnostic de diabète insipide. L'IRM de la région hypothalamo-hypophysaire est normale. Le caryotype est normal. Il n'a pas de micro délétion AZF.

DISCUSSION

On pense que l'infertilité masculine est souvent multifactorielle et causée à la fois par des facteurs génétiques et extrinsèques, mais les cas d'infertilité masculine sévère ont probablement une étiologie génétique prédominante.

Alors que la majorité des cas d'infertilité masculine sont dus à des défauts quantitatifs conduisant à l'absence ou à une réduction du nombre de spermatozoïdes, de nombreux cas d'infertilité masculine sont causés par des défauts morphologiques ou qualitatifs des spermatozoïdes altérant son aptitude à féconder. La technologie de procréation assistée est principalement palliative, avec peu d'efforts pour comprendre et traiter spécifiquement les dysfonctionnements responsables de l'infertilité des couples. Malgré ses succès, près de la moitié des couples qui la sollicitent pour l'infertilité ne parviennent pas à obtenir une grossesse. Ces échecs résultent souvent d'une altération de la spermatogenèse produisant des spermatozoïdes incompatibles avec la fécondation et/ou le développement embryonnaire. Un diagnostic génétique précis est donc important pour mieux comprendre la spermatogenèse, pour améliorer le traitement actuellement disponible et pour augmenter les chances d'adopter le meilleur plan d'action pour les patients affectés.

En matière d'infertilité masculine, et en se basant sur le résultat des explorations cliniques et para cliniques, le niveau de l'atteinte est facilement identifié. Une étiologie précise est parfois retrouvée. On distingue :

I- Les insuffisances testiculaires

1- La réduction quantitative sévère du nombre de spermatozoïdes

L'azoospermie toucherait jusqu'à 1% des hommes dans la population générale. L'azoospermie est d'origine sécrétoire dans environ 60% des cas. Dans notre série, l'azoospermie est d'origine sécrétoire dans 98% des cas. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les cas d'azoospermie excrétoire ne sont pas adressés en consultation de génétique médicale.

Bien que l'infertilité masculine soit une maladie multifactorielle, on pense que les facteurs génétiques prédominent dans l'étiologie de l'azoospermie sécrétoire et de l'oligozoospermie grave. Malgré cette hypothèse, corroborée par le nombre élevé de gènes exprimés essentiellement dans les testicules, on en sait peu sur la physiopathologie de la réduction de la production de sperme, ses causes premières ou les conséquences génétiques et épi génétiques sur la production des gamètes et du futur produit de conception.

L'identification des anomalies génétiques est donc primordiale pour comprendre la spermatogenèse, adopter la meilleure ligne de conduite pour le patient et fournir un conseil génétique adéquat. Les nouvelles technologies de séquençage contribuent à l'évolution rapide du domaine récent de la génétique de l'infertilité.

Les causes testiculaires de l'azoospermie peuvent également être congénitales et/ou génétiques. Elles comprennent des anomalies génétiques (délétions du chromosome Y) et se manifestent par une aplasie des cellules germinales (syndrome des cellules de Sertoli seules) ou un arrêt de la spermatogenèse. Le phénotype typique de l'échec testiculaire se traduit par une azoospermie ou une oligozoospermie sévère (SO) (concentration des spermatozoïdes ≤ 5 millions / ml).

Étonnamment, malgré l'abondance de gènes connus pour être nécessaires à la spermatogenèse [mais identifiés principalement dans des modèles animaux], les microdélétions du chromosome Y et les anomalies chromosomiques telles que Klinefelter sont longtemps restées la seule cause génétique récurrente connue des azoospermies non-obstructives et des oligozoospermies sévères. Néanmoins, on pense que la plupart des défauts testiculaires ont une base génétique [52]. On distingue :

1.1- Les anomalies chromosomiques [53] :

L'incidence des anomalies chromosomiques est plus élevée chez les hommes infertiles que dans la population générale. En effet, ces anomalies chromosomiques entraînent un dysfonctionnement testiculaire, et sont présentes chez 7 % des hommes infertiles et ce sont les causes les plus fréquentes des azoospermies sécrétoires avec environ 20% des cas [53]. Dans notre série, 23% des patients azoospermiques ont un syndrome de klinefelter.

La fréquence des anomalies du caryotype est inversement proportionnelle au nombre de spermatozoïdes : 20 % en cas d'azoospermie, 5 % en cas d'oligospermie et moins de 1 % en cas de normospermie. Le syndrome de klinefelter constitue une cause majeure d'infertilité masculine puisque trouvée chez près de 15% des hommes azoospermiques.

Le caryotype n'est pas réalisé d'une manière systématique dans le bilan de l'infertilité masculine. C'est le premier test génétique qui devrait être effectué aux hommes qui présentent les cas suivants :

- Une azoospermie non obstructive
- Une oligospermie sévère inférieure à 1 million de spermatozoïdes/ml sur plusieurs prélèvements successifs
- Chez des sujets ayant une numération supérieure à 1 million/ml associée à des antécédents familiaux de troubles de la reproduction.

En effet, même en présence d'un facteur de risque non génétique (comme une varicocèle clinique). Ces facteurs de risque peuvent agir comme un cofacteur susceptible d'aggraver un trouble préexistant de la spermatogenèse qui peut alors conduire à une azoospermie.

Les caryotypes anormaux les plus fréquents sont :

- le syndrome de Klinefelter dont la fréquence augmente 44 fois plus chez les sujets infertiles que chez la population générale. Il représente environ 15 % de tous les cas d'azoospermie, est de loin la cause génétique d'infertilité la plus fréquente.
- le syndrome du double Y (47,XYY). La présence d'un chromosome Y surnuméraire ne s'accompagne d'une infertilité que dans la moitié des cas.
- les dysgénésies gonadiques mixtes (mosaïque 45X/46XY)
- les anomalies de structure dont la plus fréquente est la translocation robertsonnienne équilibrée.
- Dans 1,5% des cas, il s'agit d'une anomalie équilibrée des autosomes.

1.1.1- Les anomalies du nombre de chromosomes

1.1.1.1- Le Syndrome de Klinefelter [54] :

Le syndrome de Klinefelter est une anomalie chromosomique de nombre caractérisée par la présence d'un chromosome X supplémentaire dans un caryotype masculin.

Le syndrome de Klinefelter représente l'anomalie chromosomique la plus fréquente dans le sexe masculin. Son incidence est de 1 pour 500 naissances masculines. Cette incidence est pratiquement identique à celle de la trisomie 21 et est 3 fois supérieure à celle du syndrome de Turner. Au Maroc on ne dispose pas d'étude épidémiologique large concernant ce syndrome.

L'âge des parents ne parait pas jouer un rôle dans la détermination de cette anomalie, mais l'association à un âge maternel avancé est très fréquente. De plus, la présence d'une anomalie chromosomique parentale ou l'existence d'une trisomie 21 dans la famille augmente le risque d'avoir un enfant Klinefelterien.

Il est souvent diagnostiqué tardivement à l'occasion d'un bilan d'infertilité. En effet, chez les sujets présentant une azoospermie, la prévalence de ce syndrome est de 15%.

Au plan phénotypique, le syndrome de klinefelter est associé à une hypotrophie testiculaire majeure et parfois à un hypogonadisme avec gynécomastie. Le chromosome X surnuméraire induit une altération du renouvellement et une apoptose des cellules souches spermatogoniales, ce qui provoque une interruption précoce de la spermatogenèse à un stade pré-méiotique.

a- **Le caryotype** [55, 56] :

Le syndrome de klinefelter représente plus des 2/3 des anomalies chromosomiques observées chez l'homme infertile. Les caryotypes de type 47, XXY prédominent très largement.

Au cours de la prophase I de la méiose masculine normale, les chromosomes X et Y forment le corpuscule X-Y et présentent alors une inactivation de la transcription de la chromatine non appariée. Ceci pourrait inhiber l'expression de gènes situés dans les chromosomes X et Y, qui pourraient avoir un effet toxique pendant la méiose. Leur répression permettrait donc une progression méiotique adéquate. C'est le mutisme méiotique [57]. Par contre, dans Klinefelter, les deux chromosomes X homologues s'apparient, ils ne sont pas inclus dans le corpuscule X-Y et ne sont donc pas réprimés et peuvent donc produire des produits géniques potentiellement délétères.

Les formules caryotypiques plus complexes sont plus rares :

- 48, XXXY ;
- mos 47, XXY/48, XXXY ;
- 48, XXYY ;
- 49, XXXXY.

Dans ces formes complexes, le tableau clinique est souvent plus sévère, marqué par la fréquence des malformations associées et l'intensité des troubles psychiatriques.

Les formules mosaïques sont notées dans environ 4% des cas. Cependant, les techniques utilisées méconnaissent très probablement certaines de ces mosaïques en raison de l'exploration d'un nombre relativement faible de cellules dont l'origine est uniquement sanguine. Il est ainsi possible que les discordances observées dans la présentation clinique soient en rapport avec des mosaïques méconnues. Dans notre série, 15% des patients klinefelteriens ont une formule mosaïque

Les formules de type 46, XY/47, XXY sont les plus souvent rencontrées. Elle a été retrouvée chez un de nos patients.

D'autres combinaisons sont également possibles :

- Mos 46,XX/47,XXY ; retrouvée chez un de nos patients.
- Mos 46,XX/46,XY/47,XXY ;
- Mos 45,X/46,XY/47,XXY ; retrouvé chez un de nos patients.
- Mos 46,XY/48,XXX.

Ces variétés concernent des formes cliniques habituellement plus atténuées, mais cette notion n'est pas toujours vérifiée.

b- La physiopathologie du syndrome de klinefelter [58]

Chez le sujet klinefelterien (47,XXY), il y a un retard pubertaire qui peut être de 2 à 3 ans dans 50% des cas. Mais, parfois la puberté survient à un âge normal. Les testicules sont de volume normal au début, subissent un arrêt du développement suivi d'une régression bilatérale de leur volume vers l'âge de 15 à 16 ans (entre stade de Tanner II-III) et devenant durs et insensibles à l'âge de 18 à 20 ans. Le volume final est celui d'une olive (moins de 2 centimètres de longueur) secondaire à une fibrose péritubulaire et à une détérioration progressive des cellules Sertoli, et de la lignée germinale aboutissant souvent à l'apoptose des

spermatogonies et des spermatocytes et à une azoospermie. Les anomalies de cellules de Sertoli observées sont l'insuffisance de maturité, et la diminution de récepteurs aux androgènes. Dans notre étude, tous les patients klinefelteriens présentent une hypotrophie testiculaire bilatérale. Ceci peut être expliqué par l'âge relativement avancé des patients à leur première consultation

Les cellules de Leydig sont également atteintes. Les taux de testostérone diminuent typiquement à la fin de l'adolescence et l'âge adulte. La diminution la production d'androgènes est aussi variable selon les patients. Ainsi, le rapport testostérone/œstradiol peut être diminué, on aura donc une hyper-œstrogénie relative, responsable de plusieurs manifestations cliniques comme la gynécomastie.

Si 97% des klinefelteriens sont infertiles, moins de 10% des adolescents aux stades II et III de Tanner peuvent avoir des foyers résiduels de spermatogenèse préservée et ont par conséquent une cryptozoospermie ou une oligospermie compatible avec une cryoconservation de l'éjaculat. Dans la puberté précoce, des spermatozoïdes extraits à partir de microdissection testiculaire (TESE) peuvent être obtenu pour la cryoconservation. les chances de récupération de spermatozoïdes et de reproduction ultérieure ont augmenté chez les patients atteints de SK en comparaison aux hommes avec une azoospermie sécrétoire d'autres causes [59]. Les hommes avec un taux normal de testostérone avaient le taux de récupération des spermatozoïdes le plus élevée (86%), alors que ceux nécessitant un traitement médical et qui ont répondu avec une testostérone de 250 ng/dl ou plus ont un taux de récupération de sperme élevé (77%) par rapport à ceux qui ont eu une réponse de testostérone moins optimale (55%).

Bien que la plupart des hommes adultes soient azoospermes, de rares cas de SK oligospermes ont eu une grossesse réussie sans assistance médicale à la procréation. L'oligospermie est observée chez 4 à 8 % des sujets klinefelteriens. Elle est due à un mosaïcisme, surtout (46,XX/47,XXY). Dans notre série, tous nos

patients ont bénéficié d'un spermogramme objectivant une azoospermie chez tous les patients. Malheureusement, nous avons remarqué un retard diagnostique chez nos patients en général, et particulièrement chez ceux présentant un syndrome de klinefelter. L'âge moyen à la première consultation dans notre unité est de 36,9 ans.

c- Le tableau clinique [60]

Le sujet klinefelterien présente un aspect longiligne, avec une taille moyenne de 1,75 m, supérieure à celle de la population générale. On note aussi la présence d'une macroskélie (la taille des membres est supérieure à la moitié de la taille globale) dans 75% des cas, d'une allure eunuchoïde et d'un élargissement du diamètre bi-trochantérien avec une répartition gynoïde de la graisse. La macroskélie est due au gène *SHOX* exprimé dans les chromosomes sexuels, et qui régule la croissance. Ce gène situé sur PAR1, s'échappe à l'inactivation qui atteint les chromosomes X, et stimule la croissance. Dans notre série, la macroskélie a été retrouvée chez 38,5 % des Klinefelteriens.

La gynécomastie est retrouvée chez 12,4% à 50% des patients [61]. Elle est retrouvée chez 15,4% des patients klinefelteriens de notre série.

La cryptorchidie uni ou bilatérale peut se voir dans 7% des cas. La taille de la verge est souvent normale, et on a très rarement une verge diminuée de taille ou un hypospadias. La circonférence pénienne peut être diminuée chez certains adolescents, alors que les garçons de 48, XXXY peut avoir un épaissement de la peau du pénis avec circonférence et longueur élevée [62]. Dans notre série, 7,7 % des patients Klinefelteriens ont une cryptorchidie, ce qui concorde avec les données de la littérature. Par contre 15,4 % ont un micro pénis, ce qui est trop élevé par rapport aux données de la littérature. Ceci nous interpelle sur la méthodologie adoptée pour retenir ce signe.

La musculature du sujet klinefelterien est peu développée. La chevelure est fine, sans golfs frontaux. La pilosité pubienne est normalement fournie, estimée à

P4 de la classification de TANNER dans 75% des cas, et est souvent triangulaire, horizontale de type féminin dans 50% des cas. Quand à la pilosité axillaire, elle est pauvre alors que le thorax est glabre. La barbe est faible et 50% des sujets sont imberbes. Dans notre série, 31% des patients ont une hypo-pilosité.

Les adultes ayant le SK présentent souvent une diminution de la densité minérale osseuse (DMO) en rapport plutôt avec une diminution du taux sérique de l'Insuline like 3 (INSL3), qu'un déficit androgénique [63]. Dans notre série, aucun de nos patients n'avait bénéficié d'un bilan à la recherche d'une perturbation métabolique.

La dysfonction sexuelle est une caractéristique commune de SK. 60,9% des patients rapportent une baisse du désir sexuel, 22,7% avec une dysfonction érectile sévère (une érection n'est pas suffisante pour la pénétration dans plus de 75% des cas), 9,5% présentent une éjaculation prématurée et 9,5% une éjaculation retardée [64 ; 65]. La Présence d'une dysfonction érectile a été retrouvée chez 23 % de nos patients. Une baisse de la libido a été retrouvée chez 31% de nos cas klinefelteriens. Ceci est concordant avec la littérature.

Lorsque les patients ayant un SK ont été comparés avec des sujets témoins avec un taux de Testostérone apparié, tous les problèmes sexuels et non sexuels mentionnés ci-dessus ne sont plus liés au SK. Cette étude cas témoin indique que la dysfonction sexuelle, éventuellement présent chez les sujets KS, est liée plutôt à la carence en testostérone qu'à l'anomalie génétique [64 ; 65].

Les performances psychoaffectives et intellectuelles [66].

La personnalité du klinefelterien est marquée par une timidité, une apathie, un repli sur soi, des difficultés relationnelles, un manque de confiance en soi, une passivité et une instabilité émotionnelle.

Au niveau cognitif, l'intelligence de SK se situe dans la norme mais avec des traits spécifiques. Il existe une prévalence importante de retard du langage, un faible niveau verbal alors que les performances se situent dans la moyenne. Les déficits du langage sont à l'origine de difficultés scolaires avec difficultés d'apprentissage de la lecture, une diminution des performances en mathématiques et des troubles de mémoires, et se poursuivent par des altérations des performances jusqu'à l'âge adulte.

d- le Bilan hormonal :

Seuls 52,8% des patients atteints de SK ont une testostéronémie diminuée [61]. Dans notre série, le taux de la testostérone était bas chez 50% des patients klinefelteriens. Ceci est concordant avec la littérature.

Le taux de la FSH chez les sujets klinefelteriens est élevé de l'ordre de 32 ng/ml en moyenne et 3% seulement avaient un taux normal [61].

La sécrétion sertolienne d'inhibine B est effondrée chez la majorité des malades klinefelterien [67]. Dans notre série, Le taux de l'hormone FSH est élevé chez 88 % des patients klinefelteriens.

e- Echographie scrotale :

Les patients présentent une hypotrophie testiculaire importante. On peut aussi retrouver des microlithiases de grade 1 et des nodules de tailles variables correspondant à une hyperplasie leydigienne [68].

1.1.1.2- Le caryotype 47,XXY

C'est la deuxième cause fréquente d'anomalies gonosomiques après le syndrome de klinefelter. Si la plupart de ces hommes sont fertiles, la fréquence de cette anomalie est cependant quatre fois plus élevée chez les sujets infertiles que dans la population générale. La question se pose alors de savoir pourquoi seulement certains individus 47,XXY présentent des problèmes de fertilité. Pour les formes mosaïques, plusieurs hypothèses ont été posées pour expliquer l'infertilité chez ces

patients. Notamment l'appariement des gonosomes et la formation du corpuscule XY. Des études en FISH ont montré que la majorité des spermatozoïdes produits par ces hommes ont un caryotype équilibré, ce qui suppose soit l'élimination systématique de l'Y surnuméraire pendant la méiose, soit la dégénérescence des cellules anormales. À l'heure actuelle, il n'a pas été montré de risque accru pour la descendance de ces patients 47,XYY.

Dans notre série, nous n'avons trouvé aucun cas avec un caryotype 47,XYY.

1.1.1.3- Estimation de l'aneuploïdie au niveau des spermatozoïdes et du risque de non-disjonction

Technique : hybridation in situ multifuorescente.

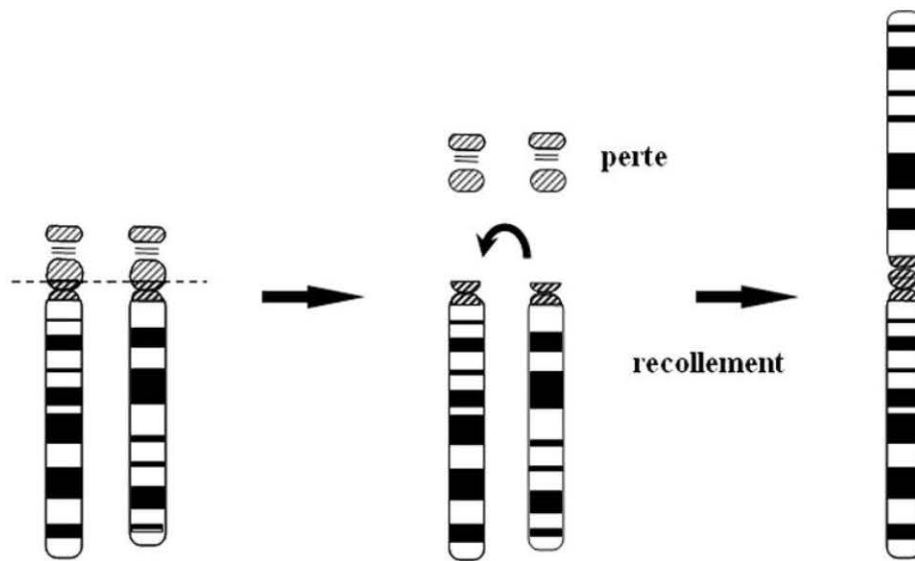
Principe : sur un test de migration survie si possible et suite à un traitement de choc hypotonique et fixation des spermatozoïdes, un cocktail de sondes spécifiques est hybridé 12 à 14 h. Après lavage des lames pour éliminer les hybridations non spécifiques, une estimation de la disomie chromosomique est proposée après analyse d'un minimum de 1000 spermatozoïdes si possible.

1.1.2- Les anomalies de structure chromosomique :

L'analyse par caryotype permet également de détecter des translocations chromosomiques équilibrées, environ 10 fois plus fréquentes chez les hommes infertiles que chez les hommes dans la population générale et sont retrouvés chez plus de 1% des patients atteints d'azoospermie [55].

a- Les anomalies chromosomiques équilibrées [69].

Les patients porteurs d'une translocation robertsonienne ont un caryotype à 45 chromosomes. En effet, le fragment centrique composé des bras courts des acrocentriques est perdu (figure 26). La perte du bras court des chromosomes transloqués n'a pas de traduction clinique. Lors de la méiose, il existe un risque de formation de gamètes déséquilibrés donnant des zygotes trisomiques ou monosomiques pour la totalité d'un chromosome.



der(13;14)(q10;q10)

Figure 26 : Mécanisme de formation d'une translocation robertsonienne entre un chromosome 13 et un chromosome 14 [69].

Les Translocations réciproques sont dues à des échanges de segments chromosomiques entre deux chromosomes, les points de cassure s'étant produits ailleurs que dans les régions juxta-centromériques des acrocentriques (Figure 27).

Lors de la méiose, la formation des bivalents ne peut pas s'effectuer normalement et il y a formation de tétravalent. Lors de la ségrégation différentes possibilités peuvent exister générant la formation de gamètes normaux ou équilibrés ou de gamètes déséquilibrés.

Il existe 3 grands types de ségrégation qui sont par ordre de fréquence :

- Les ségrégations de type 2 :2 : deux chromosomes sont transmis dans chaque gamète.
- Les ségrégations de type 3 :1 : 3 chromosomes sont transmises dans un gamète alors qu'un seul est transmis dans l'autre

- Les ségrégations de type 4 :0 : 4 chromosomes dans un gamète, 0 dans l'autre.
- Les ségrégations de type 2 :2 peuvent être alterne ou adjacente avec deux sous types de ségrégation adjacente : le type 1 et le type 2.
- Les ségrégations méiotiques de type alterne sont les plus fréquentes. Elles produisent des gamètes équilibrés ou normaux. Les ségrégations de type adjacent sont responsables de la formation de gamètes non équilibrés (Figure 28) :
- Le type adjacent-1 : l'un des deux chromosomes remaniés est transmis avec l'homologue normal de l'autre chromosome. Il en résulte une duplication de l'un des segments transloqués et une monosomie de l'autre segment. Les deux combinaisons réciproques sont bien entendu possibles.
- Le type adjacent-2 : il est exceptionnel. L'un des deux chromosomes remaniés est transmis avec son propre homologue. Il existe alors une duplication/déficiences des segments centriques des chromosomes remaniés, sans déséquilibre des parties transloquées.

Ces deux types de ségrégation donnent des zygotes non équilibrés ayant 46 chromosomes [69].

Les ségrégations de type 3 :1 sont rares et les zygotes qui en résultent ont 45 ou 47 chromosomes. Les deux chromosomes remaniés peuvent être transmis avec un homologue normal, ou un seul chromosome remanié est transmis avec les deux homologues normaux.

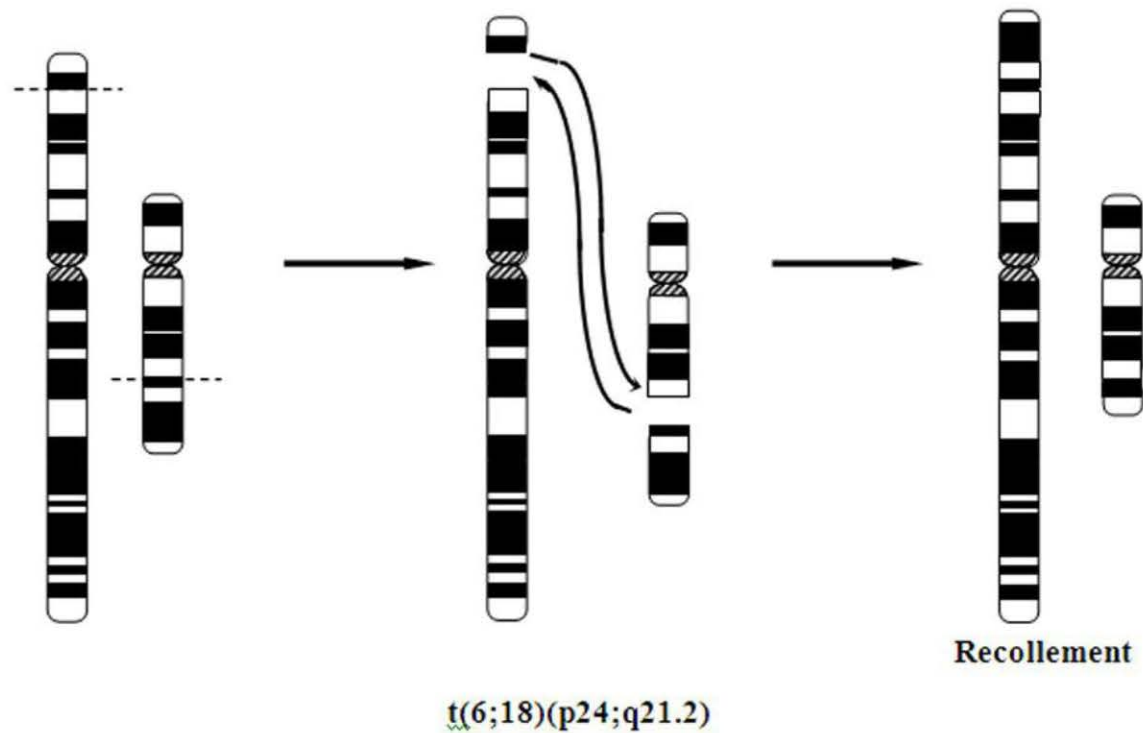


Figure 27 : Mécanisme de formation d'une translocation réciproque entre le bras court d'un chromosome 6 et le bras long d'un chromosome 18 [69].

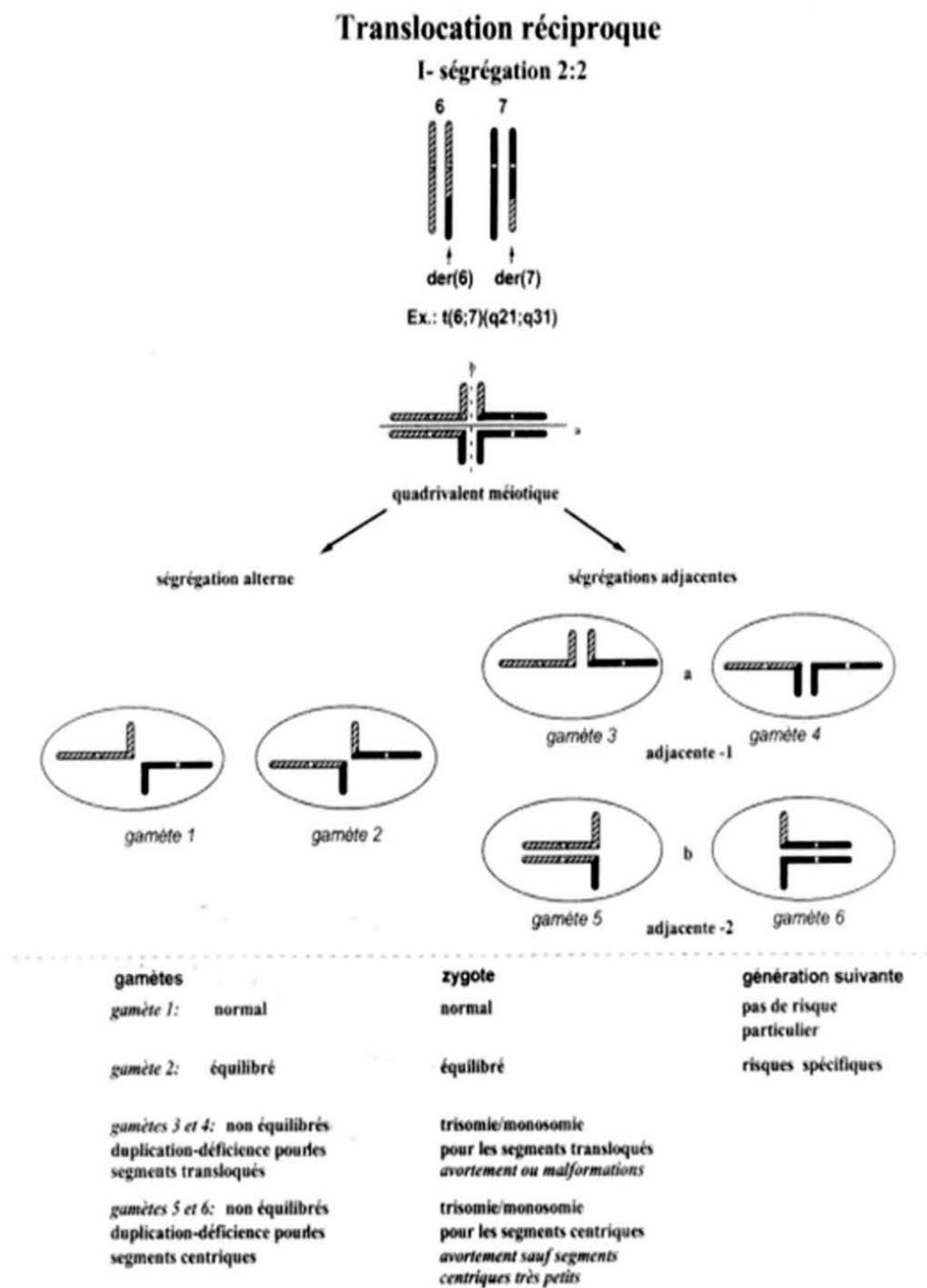


Figure 28 : Ségrégation de type 2:2 d'une translocation réciproque [69].

De plus, dans les translocations équilibrées, l'appariement est altéré au niveau des points de cassure de la translocation menant à l'inclusion de séquences autosomiques dans le corpuscule X-Y où se produit le mutisme méiotique. Ces régions non appariées subissent de façon inappropriée une inactivation, pouvant entraîner l'inactivation de gènes nécessaires aux fonctions cellulaires de base ou à la progression méiotique ce qui entraîne un arrêt méiotique [70].

Le processus d'inactivation des chromosomes transloqués ne se ferait que dans un pourcentage variable de cellules méiotiques, ce qui expliquerait une atteinte testiculaire parfois modérée chez certains patients et les différences observées entre sujets porteurs d'un même remaniement chromosomique dans une famille.

L'appariement méiotique des chromosomes peut également être altéré pour des chromosomes porteurs d'une inversion, entraînant ainsi des problèmes de fertilité, surtout si cette inversion n'inclue pas le centromère (paracentrique). Dans ce dernier cas, il y a formation d'un chromosome totalement anormal possédant 2 centromères qui vont bloquer la cellule au moment de l'anaphase (Figure 29). Selon le pourcentage de cellules dans lesquelles on a des chromosomes anormaux, la production de cellules germinales peut être altérée jusqu'à aboutir à une infertilité:.

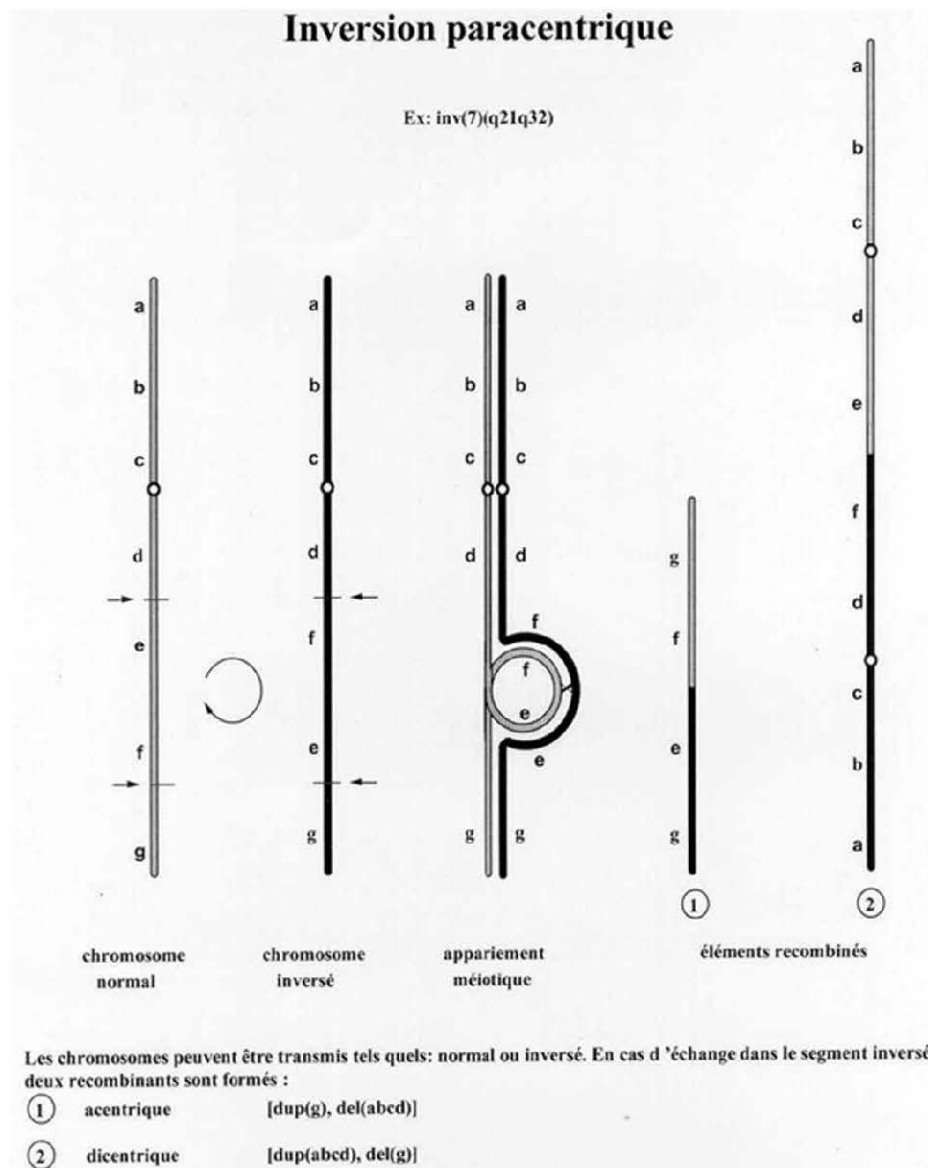


Figure 29 : Recombinaison méiotique suite à la présence d'une inversion paracentrique [69].

A la différence de la CGH array, le caryotype permet de visualiser la morphologie des chromosomes et ainsi, la mise en évidence des remaniements chromosomiques équilibrés. Le caryotype est par conséquent essentiel au bilan réalisé dans le cadre de troubles de la fertilité (azoospermie ou oligospermie sévère) ou même d'avortements spontanés à répétition. Il permet la détection d'une translocation réciproque ou Robertsonienne parentale équilibrée. A ce jour, les puces à ADN ne permettent pas de répondre à cette question [69].

b- Les microdélétions du chromosome Y

La région euchromatique Y renferme des gènes impliqués dans le déterminisme du sexe, le contrôle de la taille, la spermatogenèse ou encore des gènes dont la délétion entraîne des symptômes Turnerien. 3 loci sur le bras long du chromosome Y, nommés AzFa, AzFb, et AzFc (azoospermia Factors), comportent de 15 à 20 gènes indispensables à la spermatogenèse. Les anomalies du chromosome Y seraient responsables de 7 % des infertilités masculines. Il s'agit surtout de délétions larges multigènes récurrentes intéressant les intervalles (AZFa, AZFb ou AZFc) sont trouvées chez plus de 10% des hommes avec azoospermie sécrétoire et chez environ 3% des hommes infertiles dont le nombre de spermatozoïdes est fortement réduit (<1 million / ml). Dans notre série, parmi les 23 cas testés, aucun cas ne présente de micro délétion de l'AZF. Ceci peut être expliqué par la petite taille de notre échantillon. D'autre part, 75% des patients infertiles à caryotype normal n'ont pas bénéficié de ce test. Nous recommandons la réalisation du test de micro délétion de l'AZF à chaque fois que l'indication existe.

La recherche de micro délétions des régions AZF du chromosome Y est indiquée en cas d'azoospermie ou d'oligozoospermie sévère (<5 millions/ml) d'origine sécrétoire.

La plupart des délétions dans chacun des intervalles AZF incluent plusieurs gènes, de ce fait, on n'a pas encore identifié le ou les gènes nécessaires à la pleine fertilité masculine.

Chez des hommes stériles, on a pu retrouver une délétion courte ou une mutation de type perte de la fonction, d'un seul gène, soit le gène *USP9Y* dans l'intervalle AZFa [71], ou le gène *HSFY* dans l'intervalle AZFb [72]. Cependant, Les hommes dépourvus uniquement du gène *USP9Y* ou du gène *HSFY* produisent des spermatozoïdes et peuvent être naturellement fertiles, excluant ainsi *USP9Y* comme nécessaire pour la survie des cellules germinales et *HSFY* comme nécessaire pour la progression méiotique chez l'homme.

Les délétions complètes de l'AZFa éliminent deux gènes, *USP9Y* et *DDX3Y*, et sont associées à une azoospermie dans le cadre du syndrome des cellules de sertoli seules, le phénotype testiculaire le plus grave caractérisé par l'absence complète de toutes les cellules germinales dans les tubes testiculaires.

Les deletions complètes d'AZFb éliminent toutes les copies des genes *HSFY*, *EIF1AY*, *KDM5D*, *RPS4Y2*, *PRY* et *RBMY1*. Elles sont associées à une azoospermie consécutive à un arrêt de la maturation méiotique de cellules germinales. L'intervalle AZFb porte le gène *EIF1AY*, codant pour un facteur d'initiation de la traduction : EIF1AY qui est directement impliqué dans la reconnaissance du codon d'initiation par l'ARNt-Met. L'efficacité de cette étape pourrait être critique pour la méiose masculine.

Une des causes génétiques les plus fréquentes de l'infertilité masculine est la délétion récurrente d'AZFc. Elle serait responsable de 6% des défaillances sévères de la spermatogénèse [73]. De grandes délétions de l'intervalle AZFc, toutefois partielles car ne supprimant pas toutes les copies des gènes multi-copies encodants de cet interval : *DAZ*, *CDY1* et *BPY2*, n'ont qu'un modeste effet négatif sur la fertilité masculine [73].

c- le syndrome de la chapelle

Elle est observée chez environ un homme sur 20 000 et chez environ 0,9 % des patients azoospermiques. La formule chromosomique 46,XX. Dans la grande majorité des cas, le gène *SRY* est présent, suite à la translocation d'une portion du bras court du chromosome Y. Ces patients présentent une hypotrophie testiculaire et sont stériles par absence de cellules germinales. Dans quelques rares cas, le gène *SRY* est absent, le phénotype résulte alors de l'atteinte d'un autre gène, impliqué dans la cascade du déterminisme sexuel entraînant la formation du testicule comme une duplication du promoteur du gène *SOX9*.

À l'heure actuelle, l'analyse du caryotype et le dépistage de la microdélétion Y restent les tests génétiques les plus pertinents dans les cas d'azoospermie sécrétoire et d'oligoasthenospermie sévère.

1.2- Les anomalies monogéniques

a- Les causes autosomiques récessives

Elles sont rares :

Le gène *TAF4B* sur le chromosome 18, code pour un facteur de transcription qui se lie à TATA box prédominant dans le testicule. Sa mutation non-sens p.Arg611* altère la Prolifération des spermatogonies [74].

Le gène *ZMYND15* sur le chromosome 1, code pour un répresseur transcriptionnel dépendant de l'histone désacétylase spécifique des spermatides. Sa mutation Frameshift p.Leu507fs*3 non-sens et délétion de 4 pb empêche l'expression de la protéine, conduit à une azoospermie par Arrêt de maturation des spermatides [74].

3 autres gènes exprimés principalement dans les testicules, et dont la mutation « perte de fonction » homozygote rare a été validée comme causale de l'azoospermie sécrétoire par bloc méiotique :

- Le gène *SYCE1* sur le chromosome 10 code pour un composant de l'élément central du complexe synaptonemal de la méiose. La mutation intronique c.197-2A>G entraîne une anomalie de l'épissage causant un arrêt de la méiose [75].
- Le gène *TEX15* sur le chromosome 8 intervient dans l'appariement et la recombinaison des chromosomes durant la méiose ainsi que la réparation de l'ADN. Sa mutation non-sens p.Y710* cause une azoospermie/oligozoospermie [76].
- Le gène *MCM8* sur le chromosome 20 a un rôle crucial dans la méiose masculine et féminine en intervenant dans la stabilité du génome, la réparation médiée par une recombinaison Homologue durant la méiose et aussi la réparation de l'ADN des cellules Somatiques. Sa mutation intronique c.1954-1G> entraîne une anomalie de l'épissage causant une azoospermie [77].
- Le gène *NPAS2* situé sur le chromosome 2 est un composant de l'horloge circadienne dont l'expression prédomine dans le système nerveux, et non dans le testicule. Il code pour un activateur Transcriptionnel qui régule le cycle cellulaire et les gènes de réparation de l'ADN. Sa mutation Faux-sens p.Pro455Ala a été décrite en cas d'Azoospermie. Mais son effet causal nécessite une validation supplémentaire [78].
- La mutation inactivatrice du gène *FSHR* localisé dans le chromosome 2 et codant pour le récepteur de l'hormone folliculo-stimulante empêche la stimulation des cellules de Sertoli par cette gonadotrophine.
- L'Infertilité masculine par défaillance testiculaire peut être due au déficit fonctionnel en androgènes. On note une altération de l'effet des androgènes sur les testicules. La principale cause de cette altération est une mutation

homozygote c.591G>T inactivatrice du gène *SRD5A2*, entraînant un déficit en 5 α - réductase de type 2 qui transforme la testostérone en sa forme active. Chez ces patients le phénotype est variable allant d'un hypospadias à l'ambiguïté sexuelle. L'infertilité est quasi constante.

b- Les causes liées au chromosome X

Le gène *TEX11* sur le chromosome X intervient durant la méiose dans l'appariement et la recombinaison des chromosomes. Chez 1% des hommes azoospermiques, des mutations de type « perte de fonction » causales ont été identifiées entraînant un arrêt méiotique [79] :

- 3 mutations introniques du site d'épissage : c.1838-1G>A, c.792+1G>A et c.1837+1G>C.
- Mutation type décalage de trame Asp435Leufs*10
- Délétion de 79 acides aminés : p. (Thr218_Lys296del).

Chez 2 hommes non apparentés, il a été découvert une délétion de 79 acides aminés, une double délétion complexe et une inversion entraînant la perte des exons 10, 11 et 12 sans décalage de cadre de lecture [79]. Sa complexité soulève la possibilité que cette délétion ait transmise par un individu fondateur, et que l'anomalie laisse une progression vers des stades post-méiotiques dans certains tubules et donne une oligozoospermie permettant sa transmission. Il subsiste donc un doute mineur sur le fait que la délétion de p. (Thr218_Lys296del) est la cause de l'arrêt de maturation.

Le syndrome d'insensibilité aux androgènes dans sa forme partielle lié à une mutation des récepteurs aux androgènes. Le phénotype est variable allant d'un phénotype male infertile à un phénotype féminin.

Il est intrigant de constater que les mutations sur le chromosome X, qui devraient être sélectionnées négativement chez l'homme, sont retrouvées avec une fréquence relativement élevée chez les hommes infertiles.

Compte tenu de l'abondance présumée de gènes impliqués dans la spermatogenèse liés à l'X, de nombreux autres variants rares liés à l'X devraient être identifiés dans un proche avenir.

c- Les variations du nombre de copies (CNV)

En dehors des micro délétions déjà discutées sur le chromosome Y, il n'y a pas de délétions ou de duplications importantes récurrentes. Néanmoins, des CNV (Délétions ou duplications) ont été identifiés chez un faible pourcentage de patients infertiles. Ils représentent un facteur de risque spécifique de l'azoospermie sécrétoire ou l'oligospermie sévère. Par rapport aux témoins, Il existe un effet de dose de la CNV chez les hommes infertiles, basé sur la taille du segment affecté et sur sa fréquence. Ceci est particulièrement prononcé sur les chromosomes sexuels [80].

2 régions ont été délétées avec une fréquence plus élevée chez les patients que chez les contrôles :

- La délétion d'un segment de 100 kb sur Xp11.23, flanquée de deux blocs quasi-identiques et contenant le gène *SPACA5* codant la protéine associée à l'acrosome. Cette délétion a été constatée chez 2,8% des patients et 0,7% des témoins [80].

- La délétion d'un segment de taille variable du bras court du chromosome 9, autour du gène *DMRT1* impliqué dans le développement testiculaire. On le trouve chez 0,38% des patients contre 0% des témoins.

Les délétions ou les duplications du réseau tandem *DYZ19* sur le chromosome Y. ces anomalies sont 4 à 5 fois plus fréquentes chez les patients que chez les témoins (6,1% contre 1,3%).

La duplication d'un segment situé sur le chromosome 1, mesurant au minimum 338 kb. Le gène critique inclus dans ce segment reste incertain. Ca peut être le gène *IPP*, *PIK3R3* ou *MAST2*. Une étude de réplication a révélé la duplication d'un marqueur dans *MAST2* chez 0,7% des hommes avec azoospermie sécrétoire et 0,06% des témoins. Le segment dupliqué comprend également deux autres (polypeptide intracisternel activé par une particule) et (sous-unité régulatrice de la phosphoinositide-3-kinase 3), tous deux exprimés dans le testicule, mais ceux-ci n'ont pas été testés. Par conséquent, il dans le segment dupliqué [81].

d- Les causes dominantes autosomales et liées à l'X – approche du gène candidat

Chez des hommes souffrant d'infertilité isolée, les efforts de séquençage visant à identifier des mutations dans des gènes candidats individuels n'ont pas été une stratégie efficace pour l'identification de causes génétiques de l'infertilité masculine. Cette stratégie a identifié dans plusieurs gènes des variants hétérozygotes à basse fréquence dont chacun ne peut avoir qu'un léger effet négatif sur la fertilité. Cela semble logique car un variant à impact négatif fort et dominant sur la fertilité masculine sera rapidement éliminée de la population.

Avant d'interpréter les résultats, Il est important de vérifier les fréquences d'allèles dans le Consortium Exome Aggregation (ExAC) (URL: <http://exac.broadinstitute.org>) qui fourni des connaissances sur la variation génétique humaine afin de pouvoir évaluer la force du lien entre une variante génétique et l'échec de la spermatogenèse.

Vu que les données sont générées à partir de seulement un ou peu de gènes, il est difficile de savoir si un variant est la principale cause d'infertilité ou s'il est l'un de plusieurs facteurs contributifs.

Chez un homme avec oligospermie sévère (1,7 millions de spermatozoïdes / ml), une anomalie d'épissage à l'état hétérozygote du gène *KLHL10* observée au niveau de l'ARN, pourrait être la cause de l'infertilité, mais nécessite une validation supplémentaire [82].

Des études ont été réalisées sur 3 gènes : *MTHFR* [83] (méthylène-tétrahydrofolate réductase), *GSTM1* [84] (glutathion S-transférase mu 1) et *FSHB* [85] (sous-unité bêta de l'hormone FSH) révélant des variants significativement associés à l'infertilité, mais n'ayant qu'un léger effet négatif.

Le gène *NR5A1* (sous-famille de récepteurs nucléaires 5, groupe A, membre 1), code pour le régulateur de transcription SF1 nécessaire pour la détermination du développement testiculaire et gonadique. Chez 0,6, 1,7 et 4% des hommes atteints d'azoospermie ou de SO, des variants faux-sens de *NR5A1* sont présents et seraient des facteurs de risque contribuant à un échec spermatogénèse plutôt que des causes génétiques dominantes primaires [86].

Enfin, Nous ne devrions pas conclure que les causes génétiques de l'échec de la spermatogénèse sont principalement récessives, car l'approche de la famille consanguine est fortement biaisée dans ce sens. Lorsque les milliers de données de séquences d'exomes ou de séquences complètes du génome des hommes avec azoospermie sécrétoire et oligospermie sévère seront disponibles dans le domaine public, Nous pourrions alors déterminer le vrai impact de ce type de variant.

e- L'approche des études d'association pangénomique (GWAS) [87].

Des études d'association pangénomique ont également été utilisées pour définir les causes génétiques de l'infertilité masculine. Des ensembles complets de

SNP génomiques connus ont été criblés par micropuce pour identifier les variants associés à l'azoospermie sécrétoire. Ces GWAS n'ont détecté aucune association forte avec l'infertilité masculine, cela indique qu'il n'y a aucun locus de gène variant ou muté qui est une cause fréquente d'azoospermie sécrétoire. Ces résultats des GWAS sont cohérents avec un modèle d'hétérogénéité de locus pour les causes génétiques de l'azoospermie sécrétoire. Cela correspond parfaitement à deux faits :

- le testicule est l'organe qui exprime le plus grand nombre de transcrits spécifiques au tissu ($n \geq 1000$),
- dans des modèles de souris knock-out pour plus de 388 gènes, une spermatogenèse altérée a été observée [88].

Il est clair qu'à présent, avec moins de 10 gènes liés à l'ANO/OS identifiés, nous sommes loin d'établir une classification génique de l'infertilité masculine associée à l'ANO ou à l'OS.

2- Les anomalies de la morphologie ou de la fonction des spermatozoïdes

Les sujets présentant un phénotype spécifique du sperme térazoospermie monomorphe, avec plus de 85% des spermatozoïdes présentant cette anomalie spécifique sont plus susceptibles d'avoir une origine commune facilitant ainsi la recherche de facteurs de causalité.

La caractérisation morphologique des anomalies des spermatozoïdes a permis de définir des phénotypes spécifiques augmentant la probabilité d'une étiologie commune au sein de chaque phénotype. Plusieurs anomalies génétiques conduisant à des anomalies spécifiques des spermatozoïdes ont été identifiées. Les études d'association n'ont pas fourni de preuve génétique solide d'une contribution monogénique seule.

2.1- Les anomalies de la tête du spermatozoïde

a- Spermatozoïdes multi flagellaires à tête large

La macrozoospermie ou spermatozoïde multiflagellaire à grosse tête est une anomalie rare du spermatozoïde caractérisée par la présence dans l'éjaculat de près de 100% de spermatozoïdes anormaux avec une grosse tête irrégulière, un acrosome anormal, une pièce intermédiaire anormale et de multiples flagelles. Ce phénotype est souvent associé à une oligoasthénospermie sévère. Un taux élevé de ces spermatozoïdes multiflagellaires à grosse tête présente une polyploïdie ou autres aneuploïdies. Il existe des formes partielles de ce syndrome caractérisées par divers pourcentages de spermatozoïdes euploïdes, fortement corrélés au rapport de spermatozoïdes de taille normale [89].

Chez 83,7% des patients avec macrozoospermie, on retrouve une anomalie au niveau du gène *AURKC* (Aurora kinase C) localisé sur le chromosome 19 [90 ; 91; 92]. Chez les hommes stériles du Maghreb, et plus particulièrement au Maroc, la prévalence des mutations homozygotes *AURKC* est relativement élevée comprise entre 0,4 et 2,7% [93].

La délétion homozygote (c. 144delC) du gène *AURKC* produit un transcrit tronqué qui est dégradé par le mécanisme de désintégration des ARNm non-sens [91]. Ces spermatozoïdes macrozoospermiques des patients mutés *AURKC* présentent une tétraploïdie, car les spermatocytes I subissent la synthèse de l'ADN mais ne peuvent compléter aucune des deux divisions méiotiques. Cependant, malgré cette non-disjonction chromosomique au cours de la méiose, la spermiogénèse n'est pas bloquée, ce qui suggère que les contrôles aux points de contrôle méiotiques sont supprimés chez ces patients [91].

AURKC est une sérine/thréonine kinase composant du complexe protéique « chromosomal passenger » en particulier dans les spermatocytes en division méiotique. En général, ce complexe « chromosomal passenger » se lie aux

centromères pour réguler les événements mitotiques et méiotiques, y compris la ségrégation chromosomique et la cytokinèse. Le complexe « chromosomal passenger » corrige les attaches kinétochore-microtubules inappropriées, en provoquant leur déstabilisation et/ou la dépolymérisation de leurs microtubules, générant des kinétochores temporairement non attachés qui seront détectés par le point de contrôle de l'assemblage du fuseau. Le complexe « chromosomal passenger » intervient directement dans le point de contrôle de l'assemblage du fuseau [94]. L'affaiblissement des fonctions du complexe 'chromosomal passenger' conduit à une altération du point de contrôle de l'assemblage du fuseau méiotique, un désalignement des chromosomes en métaphase et une perturbation de leur ségrégation et échec de la cytokinèse. *AURKC* est donc nécessaire pour la cytokinèse. Son altération (ou celle d'autres protéines partenaires) au cours de la méiose devrait conduire à la production de gamètes avec un déséquilibre chromosomique [94].

Chez la femme, les mutations homozygotes d'*AURKC* sont compatibles avec une fertilité normale. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'évaluer si certaines de ces femmes sont subfertiles à cause d'une aneuploïdie par défaut d'alignement des chromosomes au cours de la méiose et/ou ont une anomalie du développement embryonnaire avec un risque accru de fausses couches. Cette différence phénotypique observée entre l'homme et la femme pourrait également être due en partie à la présence de transcrits différents dans les gonades. 3 types de transcrits *AURKC* produits par un épissage alternatif ont été décrits dans les ovaires, tandis qu'un seul transcrit a été observé dans les testicules. Cela suggère que les corrections d'erreur de microtubules pourraient être plus efficaces au cours de l'ovogenèse par rapport à la spermatogenèse et expliquent pourquoi la méiose masculine est plus gravement atteinte par des mutations *AURKC* que la méiose féminine [95].

La délétion c. 144delC représente environ 87,7% des allèles mutés [91]. Dans la population générale, on estime que 1 individu sur 250 à 1 sur 50 selon la population géographique, est porteur hétérozygote de la mutation c.144delC [96]. Chez les frères ou les parents de patients atteints de macrozoospermie porteurs d'une mutation hétérozygote AURKC, le point de contrôle de l'assemblage du fuseau est moins efficace, conduisant à de fausses couches à répétition ou de décès périnataux (figure 30). Dans notre série, chez le seul patient ayant présenté une OATS avec des spermatozoïdes macrocéphales et multi flagellaires avec un antécédent de 2 frères infertiles, nous avons retrouvé la La délétion c. 144delC plus répandue dans notre région.

La mutation non sens p.Y248 * représente environ 10,5% des allèles mutés [97] mais semble être la principale mutation observée chez les individus d'origine européenne [92]. Des mutations plus rares ont été signalées, telles qu'une mutation faux-sens dans l'exon 6 (p.C229Y) [97], et une mutation d'épissage c 436-2 A>G dans le site d'épissage consensus de l'accepteur de l'exon 5 [91]. Aucune différence n'a été observée dans les spermogrammes des patients porteurs de ces diverses mutations [92].

Chez tous les patients présentant une macrozoospermie, la stratégie de routine clinique consiste en un séquençage en première intention des exons 3 et 6 de l'*AURKC*. L'analyse des autres exons doit être limitée aux patients présentant un phénotype complet [98] :

- un pourcentage de spermatozoïdes à tête de grande taille supérieur à 70%,
- une concentration de sperme > 1 million/ml
- la présence de multiples flagelles
- et / ou un faible pourcentage de spermatozoïdes normaux (<1%).

En cas de macrozoospermie avec mutation d'*AURKC*, l'ICSI est formellement contre-indiquée même en présence de «spermatozoïdes d'aspect normal» sélectionnés car ces spermatozoïdes sont constamment aneuploïdes et empêchent le développement embryonnaire [99]. Heureusement, pour les patients ne présentant aucune mutation de l'*AURKC* et/ou présentant un phénotype partiel, le pronostic est moins mauvais. Dans ce cas, la FISH sur spermatozoïdes pourrait être utilisée pour évaluer le taux de spermatozoïdes euploïdes et la probabilité de succès. Et si l'ICSI réussie, un suivi rapproché pendant la grossesse est recommandé [99].

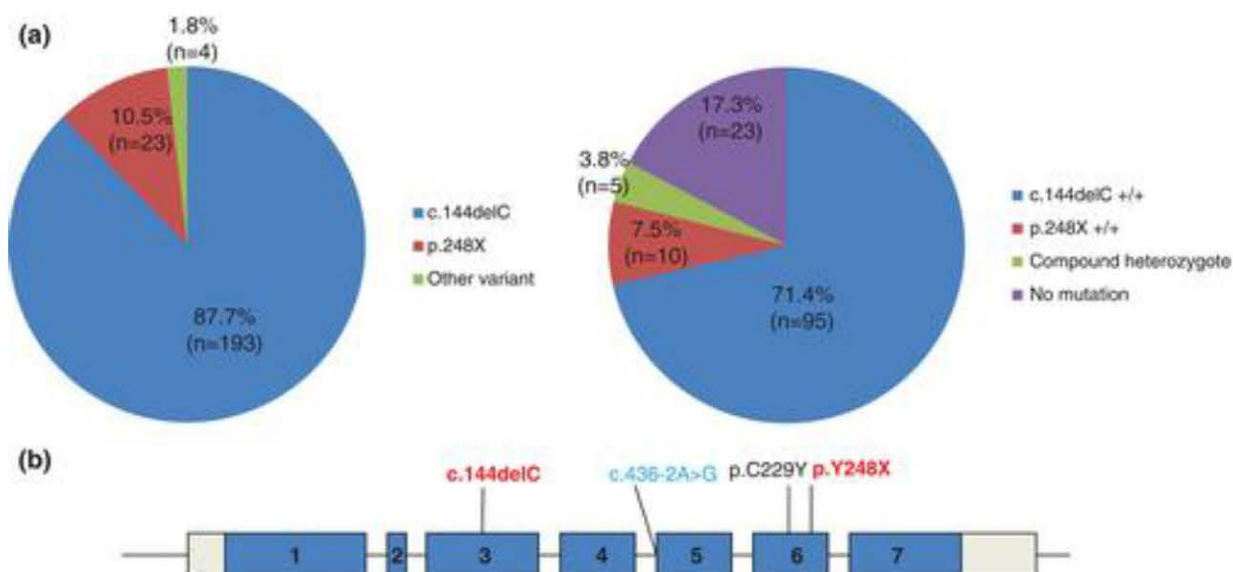


Figure 30 : Spectre mutationnel et fréquence des mutations *AURKC* [91].

(a) à gauche : la fréquence globale des mutations AURKC chez les patients non apparentés macrozoospermiques

À droite : la répartition des mutations parmi les allèles mutés.

(b) Les mutations faux-sens

Les mutations non-sense et frameshift.

Les mutations d'épissage

b- la globozoospermie

La globozoospermie est une tératozoospermie rare (incidence 0,1%), se caractérisant par la présence dans l'éjaculat d'une grande majorité de spermatozoïdes ronds dépourvus d'acrosome. On distingue la globozoospermie totale lorsque environ 100% de Spermatozoïdes sont à tête ronde ; et la globozoospermie partielle décrivant des patients présentant une proportion variable de spermatozoïdes normaux ou à tête arrondi. La globozoospermie conduit à une infertilité en raison de l'incapacité des spermatozoïdes à adhérer et à pénétrer dans la zone pellucide.

Le gène *DPY19L2* localisé sur le chromosome 12 est exprimé principalement dans les spermatides, et code pour une protéine localisée dans la membrane nucléaire interne en regard de la vésicule acrosomale, elle est essentielle pour l'attache de l'acrosome au noyau au cours de la spermiogénèse [100].

Dans la population générale, la fréquence des délétions hétérozygotes du gène *DPY19L2* est estimée à 1 sur 290.

Chez les patients présentant une globozoospermie, des altérations homozygotes de *DPY19L2* ont été constatées dans 70,2% des cas. La délétion récurrente du gène *DPY19L2* représente 80,4% des allèles pathologiques. La délétion homozygote est trouvée dans 52,3% des globozoospermies [101]. Ce taux est très variable selon les ethnies. Chez des patients tunisiens présentant une globozoospermie totale, la délétion homozygote du gène *DPY19L2* a été retrouvée chez 75% des cas [100]. Cependant, chez la majorité des patients ayant dans leur sperme un faible pourcentage de spermatozoïdes à tête ronde, on ne retrouve pas d'anomalie du gène *DPY19L2*.

Le caractère récurrent de cette délétion de 200 kb s'explique par le fait que le locus *DPY19L2* est propice au réarrangement homologue non allélique (NAHR) en raison de la présence de 2 LCRs homologues (répétitions à faible nombre de copie) mesurant 28 kb et situées de part et d'autre du gène [100].

Des mutations ponctuelles homozygotes et hétérozygotes composées complètent le spectre de mutation trouvé dans *DPY19L2*. Des mutations sont plus fréquemment rapportées entre les exons 8 à 11, et notamment deux mutations faux-sens récurrentes : p.R290H et p.R298C. Ceci indique que ce domaine central de *DPY19L2* peut être responsable de fonctions critiques (figure 31) [102].

Compte tenu de ces points, en cas de globozoospermie, on commence par la recherche des délétions homozygotes de *DPY19L2*. En l'absence de délétion ou si une délétion hétérozygote est identifiée, on réalise le séquençage complet de *DPY19L2*

Chez les patients atteints de globozoospermie, l'ICSI ne donne que de faibles taux de fécondation, de grossesse et de naissances vivantes. La première explication est la réduction ou l'absence de la phospholipase C zêta (PLC ζ) impliquée dans l'activation de l'ovocyte [103]. Une deuxième explication est qu'elle pourrait être due à une condensation défectueuse de la chromatine et à une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

Dans notre série, aucun patient ne nous a été adressé pour globozoospermie. Néanmoins, la relative fréquence de cette anomalie phénotypique au Maghreb doit nous inciter à instaurer l'analyse du gène *DPY19L2* dans notre unité.

Une autre cause génétique de la globozoospermie est la très rare mutation homozygote (c. 848 G>A) du gène *SPATA16*. Ce gène situé sur le chromosome 3 code pour une protéine impliquée dans la spermiogénèse localisée dans l'appareil de Golgi et les vésicules proacrosomales des spermatides [104].

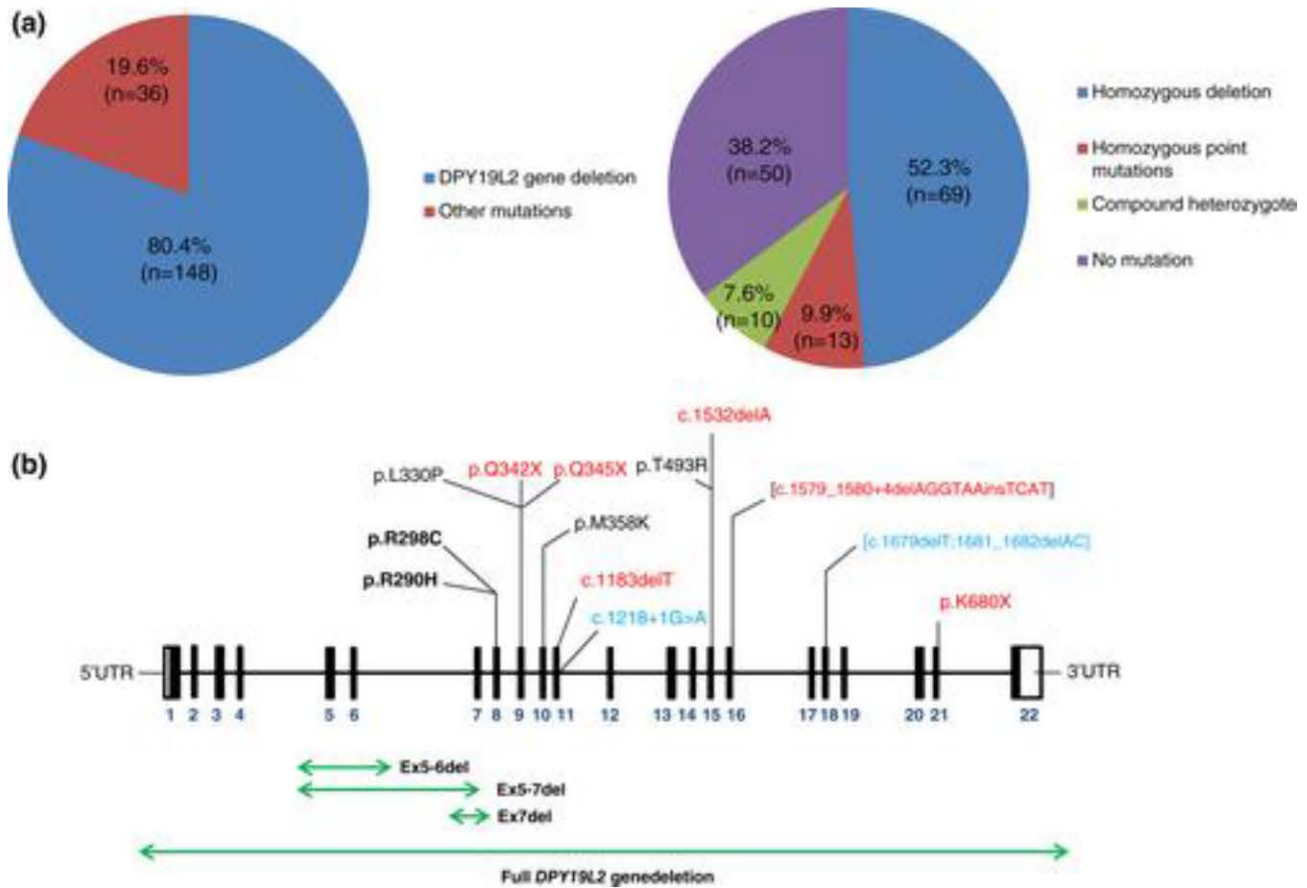


Figure 31 : Spectre de mutation et fréquence des mutations de *DPY19L2* [102].

(a) à gauche : la fréquence globale des types d'altération *DPY19L2* chez des patients non apparentés à droite : la répartition des mutations parmi les allèles mutés.

(b) Les mutations faux-sens

Les mutations non sens et décalage de cadre,

Les mutations d'épissage

Les délétions

c- Spermatozoïdes acéphaliques

Typiquement, les patients atteints de spermatozoïdes acéphales présentent dans leur éjaculation surtout des flagelles et une faible proportion de têtes de spermatozoïdes sans flagelles. Des mutations bialléliques du gène *SUN5* sont incriminées chez environ la moitié des patients [105].

Les protéines SUN sont des protéines transmembranaires localisées dans la membrane nucléaire interne qui forment des complexes LINC reliant le noyau au cytosquelette. La protéine SUN5 se situe dans les spermatides allongés et les spermatozoïdes sur la membrane nucléaire au niveau de la jonction tête-flagelle et donc impliquée dans la cimentation de cette jonction au cours de la spermiogénèse tardive.

En cas de spermatozoïdes acéphales, des anomalies du gène *SPATA6* pourraient être impliquées. Ce gène situé sur le chromosome 1 code pour un microfilament à base de myosine cytosquelettique spécifique des spermatozoïdes nécessaires pour établir une connexion étroite tête-queue [106]. Mais aucune mutation n'a encore été retrouvée chez les humains.

2.2- Anomalies du flagelle et de la motilité des spermatozoïdes

2.2.1- L'infertilité masculine associée a la dyskinésie ciliaire primaire [98]

Bien que le flagelle des spermatozoïdes et les cils vibratiles (trouvés dans les cellules épithéliales des voies respiratoires, les trompes de Fallope, le plexus choroïde et les ventricules cérébraux) soient spécialisés dans une fonction particulière, ils partagent des éléments structurels communs comme la structure centrale du cytosquelette appelée axonème. L'axonème contient 9 doublets de microtubules externes et une paire centrale (structure 9 + 2), plusieurs dynéines axonémiques, des rayons radiaux, des liens nexin et de nombreux autres composants qui entraînent et régulent la motilité ciliaire ou flagellaire. Toutes ces

protéines associées aux microtubules sont attachées le long de l'axonème dans une formation répétée régulière de 96 nm de long. Les dynéines axonémiques sont des protéines multicomposantes organisées en rangées interne et externe le long de chaque doublet de microtubules. Elles comprennent des complexes moteurs multiples qui produisent la force de battement des cils / flagelles.

Les bras de dynéine sont composés de chaînes lourdes, de chaînes intermédiaires, de chaînes légères intermédiaires et de chaînes légères et de nombreuses protéines régulatrices. La structure des bras internes de dynéine est plus complexe que celle des bras externes de la dynéine, qui ne contient que deux chaînes lourdes différentes répétées tout au long de l'axonème.

Les bras internes sont organisés en 7 complexes moléculaires, considérés comme des têtes globulaires disposées en 3-2-2 groupes, correspondant ainsi à 3 types de bras internes de dynéine (IDA) : IDA1, IDA2 et IDA3. La composition des sous-unités de chaque bras interne reste à déterminer.

Une analyse protéomique a identifié plus de 700 protéines localisées exclusivement dans le flagelle des spermatozoïdes, dont beaucoup sont des protéines axonémiques. Ces données mettent en évidence la complexité de la structure et de la biogenèse des flagelles, suggérant que de nombreux gènes pourraient être liés à des anomalies flagellaires et / ou à une asthénozoospermie [107].

La dyskinésie ciliaire primitive (DCP) est un trouble multisystémique causé par des défauts de motilité des cils mobiles et des flagelles. La dyskinésie ciliaire primitive a une incidence estimée à 1 pour 15 000 naissances. Elle se caractérise principalement par des infections récurrentes des voies respiratoires présentant des symptômes variés allant de la rhinosinusite chronique à la bronchectasie et à l'infertilité masculine due à l'immobilité des spermatozoïdes. L'hypofertilité féminine

est moins fréquente et est causée par le dysmobilité des cils des trompes de Fallope. La dyskinesie ciliaire primitive est également associée dans 50% des cas à un situs invertus en raison d'un dysfonctionnement du cil primitif mobile du nœud primitif embryonnaire, perturbant ainsi la latéralité des organes. C'est le syndrome de Kartagener. Plus rarement, l'hydrocéphalie résulte d'une dysmotilité des cils épendymaires conduisant à un blocage du flux de liquide céphalo-rachidien.

Chez 70% des patients atteints de DCP, des mutations dans 28 gènes conduisant à divers défauts ultrastructuraux ont été identifiés. Le mode de transmission est essentiellement autosomique récessif. Un phénotype d'infertilité masculine a souvent été décrit dans le cadre des symptômes cliniques, mais cet aspect particulier de la physiopathologie de la DCP n'est pas systématiquement exploré. Aucune donnée sur la fertilité des patients avec dysplasie ciliaire primitive porteur d'une mutation d'un des gènes *ARMC4*, *C21orf59*, *CCDC103*, *CCDC151*, *CCDC164 (DRC1)*, *CCDC40*, *CCDC65*, *DNAL1*, *RGPR*, *SPAG1*, *TXNDC3* n'a été rapportée. Étonnamment, les patients avec DCP porteurs de mutations du gène *DNAH11* ou *CCDC114* ont été décrits comme normalement fertiles.

Par contre, des troubles de la fertilité ont été décrits en présence de mutations de 15 gènes impliqués dans la DCP. Les spermatozoïdes des patients masculins infertiles atteints de DCP sont généralement immobiles et présentent divers défauts ultrastructuraux de leur flagelle, tels que des bras de dynéine manquants, des translocations microtubulaires et l'absence de ponts radiaires.

Néanmoins, dans la plupart des cas, le flagelle semble morphologiquement normal à la microscopie optique, excluant ainsi la plupart de ces gènes en tant que cause génétique de la tératozoospermie ou d'anomalies morphologiques multiples du flagelle (AMMF). C'est le cas des gènes suivants :

- Les gènes *DNAAF2*, *DYX1C1 (DNAAF4)* et *LRRC6* impliqués dans l'assemblage des complexes des bras de dynein dans le cytoplasme. Sa mutation cause une absence des bras de dynein internes et externes.
- Le gène *DNAH5* code pour un composant de la chaîne lourde des bras externes de dyneine. Sa mutation cause une anomalie des bras externe de dyneine.
- Le gène *DNAI1* code pour un composant de la chaîne intermédiaire des bras externes de dyneine. Sa mutation cause un raccourcissement ou une absence des bras externe de dyneine.
- Le gène *HYDIN* code pour la projection C2b de la paire centrale qui est absente en cas de mutation.

Une oligo-asthénozoospermie avec pièce intermédiaire rétrécie et un flagelle raccourci a été décrite en cas de mutation du gène *CCDC39* impliqué dans l'assemblage des bras internes de dyneine, des N-DRC et des ponts Radiaires. Sa mutation cause une désorganisation de l'axonème avec des doublets périphériques mal localisés, le déplacement ou l'absence de la paire centrale et une absence des bras internes de dyneine et des liens de Nexin.

Un phénotype d'infertilité masculine sans autre précision a été décrit pour la mutation des gènes suivants :

- Les gènes *DNAAF1* (LRRC50) et *DNAAF3* et *ZMYND10* impliqués dans l'assemblage des complexes des bras de dynein dans le cytoplasme. Sa mutation cause une absence des bras de dynein internes et externes.
- Le gène *DNAI2* code pour un composant de la chaîne intermédiaire des bras externes de dynein. Sa mutation cause une anomalie de ces bras.

- Le gène *HEATR2* impliqué dans l'assemblage et la stabilité des bras de dynein. Sa mutation cause l'absence totale du bras externe et l'absence partielle du bras interne de dyneine.
- Les gènes *RSPH1*, *RSPH4A* et *RSPH9* codent pour des composants des ponts radiaires. Leur mutation cause des anomalies du complexe de la paire de microtubules centraux et des ponts radiaires.

2.2.2- Les gènes impliqués dans l'asthénozoospermie isolée

L'asthénozoospermie peut être causée par :

- Des défauts de la morphologie du flagelle des spermatozoïdes par anomalie des protéines impliquées dans la structure et/ou l'assemblage du flagelle
- et/ou par une réaction inappropriée des spermatozoïdes aux événements de maturation ion-dépendants par anomalie des canaux ioniques situés au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde

a- Les anomalies morphologiques multiples du flagelle du spermatozoïde

Des anomalies morphologiques du flagelle du spermatozoïde conduisant à une asthénozoospermie se présentent sous différentes formes [98]. un phénotype spécifique appelé anomalies morphologiques multiples du flagelle des spermatozoïdes (AMMF) défini par une asthénozoospermie résultant d'une mosaïque d'anomalies morphologiques concernant principalement les flagelles de spermatozoïdes, notamment les flagelles absents, enroulés, courbés, angulés, irréguliers ou courts [98].

À ce jour, la majorité des AMMF restent idiopathiques. Néanmoins, chez environ 30% des patients présentant ce phénotype grave sans manifestations de « dyskinésie ciliaire primitive », le gène *DNAH1* est muté. Ce gène situé sur le chromosome 3 code pour une chaîne lourde du bras interne de dyneine axonémique contribuant à la stabilisation du rayon radial et donc de la paire centrale. Lorsque

DNAH1 est absent ou dysfonctionnel, l'axonème est extrêmement désorganisé, souvent avec une structure «9 + 0» correspondant à l'absence de paire centrale. La paire centrale joue probablement un rôle majeur dans la stabilité générale de l'organisation du flagelle et son absence pourrait être la clé centrale des mécanismes physiopathologiques aboutissant au phénotype AMMF [98]. La désorganisation axonémique sévère peut être due à l'altération d'ancrage des ponts radiaires (Figure 32).

D'autres défauts sont présents, notamment l'extension anormale des fibres denses externes 3 et 8 à la pièce principale, une distorsion de la gaine fibreuse ou une absence de la gaine mitochondriale.

Il y a un point de vue émergent selon lequel il existe un continuum phénotypique allant des patients « dysplasie ciliaire primaire » infertiles aux patients atteints d'AMMF sans manifestations de « dysplasie ciliaire primaire » [108].

Les patients atteints d'AMMF avec des mutations *DNAH1* combinent de faibles taux d'aneuploïde et une bonne qualité nucléaire des spermatozoïdes, par rapport à des patients porteurs d'AMMF idiopathique. Leurs résultats à l'ICSI sont bons [109].

Par ailleurs, Des mutations des gènes *CFAP43* et *CFAP44*, codant pour des protéines contenant des domaines répétés WD (WDR), ont été identifiées respectivement chez 12,8 et 7,7% de patients avec AMMF [110].

Enfin, des délétions dans les gènes *AKAP3* et *AKAP4*, codant pour des protéines de la gaine fibreuse pourraient être une étiologie des phénotypes d'AMMF [111].

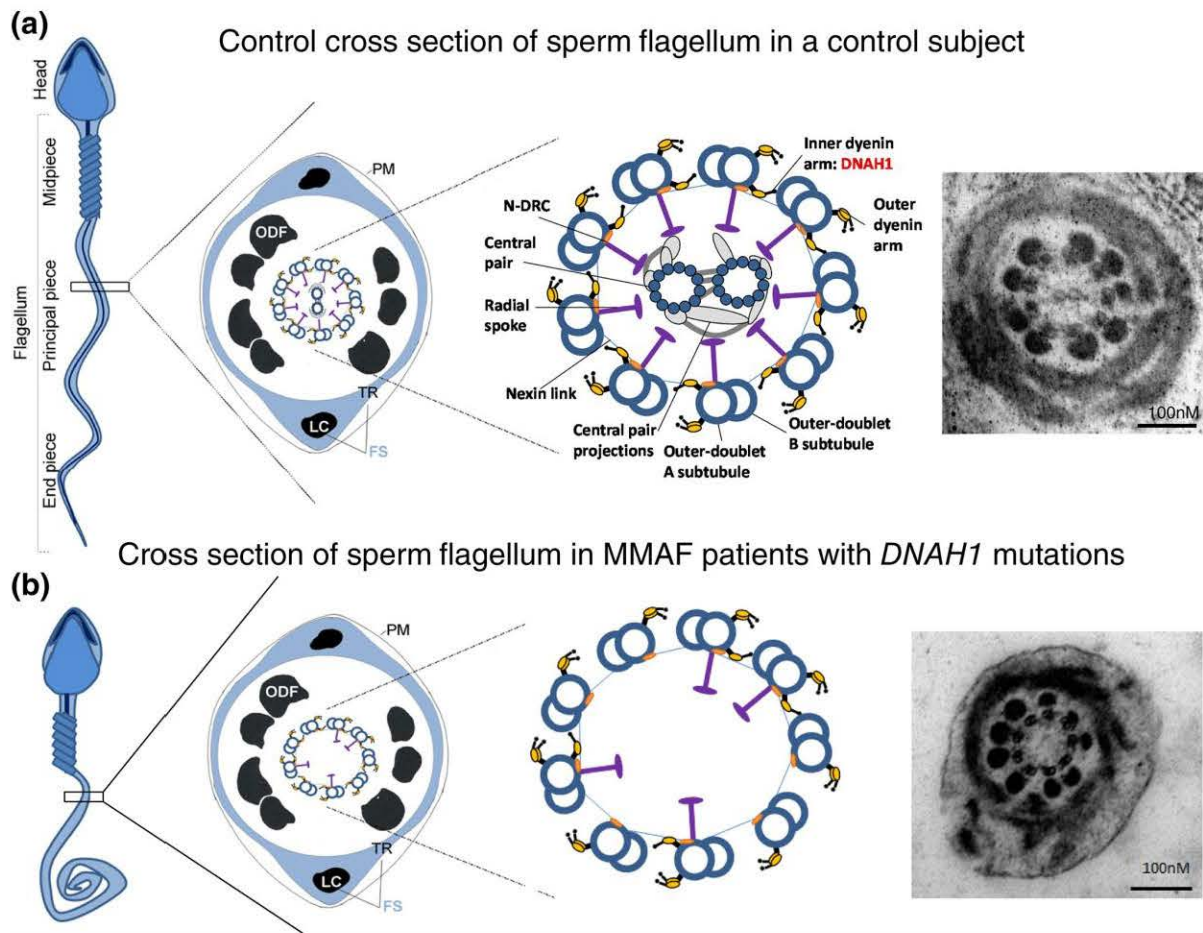


Figure 32 : anomalies flagellaires en cas de mutation de *DNAH1* [98].

- (a) schéma et imagerie par microscopie électronique ME à transmission d'une coupe transversale d'un flagelle provenant d'un spermatozoïde d'un individu témoin.
- (b) Flagelle chez un patient présentant une mutation de *DNAH1*. Coupe transversale schématique de la pièce principale montrant plusieurs défauts : absence d'IDA, désorganisation axonémique avec absence de la paire centrale. Sur le côté droit, coupe transversale ME d'un flagelle d'un patient avec *DNAH1* muté montrant une absence complète de la paire centrale

b- Asthénozoospermie et gene *SEPT12*

Une cause rare de l'asthéo-tératozoospermie est la mutation du gène *SEPT12* situé sur le chromosome 16. Les Septins 1, 4, 6, 7 et 12 appartiennent à une famille de protéines polymérisant la GTPase et formant des homofilaments et des hétérofilaments constituant de l'annulus du spermatozoïde. Un complexe de Septin stable est nécessaire à la différenciation de la queue du spermatozoïde [112]. Septin 12 est critique pour le bon déroulement de la spermiogenèse et pourrait jouer un rôle dans les processus dépendants des microtubules lors de la différenciation de la tête du spermatozoïde comme la formation de l'acrosome. Les mutations de *SEPT12* altèrent l'intégrité structurelle des spermatozoïdes en perturbant la formation.

Deux mutations hétérozygotes ont été décrites dans le domaine de la GTPase :

- La mutation p.Thr89Met au niveau de l'exon 3 réduit l'activité hydrolytique de la GTP,
- La mutation p.Asp197Asn au niveau de l'exon 6 interfère avec la liaison au GTP et entraîne la formation d'un annulus défectueux et d'un flagelle courbé [113].

Les 2 protéines mutées altèrent la formation des filaments de Septin au niveau de l'annulus à partir des Septines 12 sauvages, agissant ainsi comme protéines négatives dominantes.

c- Les anomalies de CATSPER

CATSPER est un canal situé exclusivement sur la membrane plasmique de la pièce principale du flagelle, nécessaire pour la capacitation et l'hyperactivation des spermatozoïdes car il permet l'entrée du Ca^{2+} de manière dépendante du pH et de l'AMPc. Ce canal est composé de 4 sous-unités alpha séparés formant des pores, codées par les gènes *CATSPER1-4*, et 3 sous-unités auxiliaires supplémentaires : CatSper beta codée par le gène *CATSPERB*, CatSper gamma codée par le gène *CATSPERG* et CatSper delta codée par le gène *CATSPERD* [114].

La progestérone synthétisée par les cellules du cumulus à proximité de l'ovocyte se lie au canal CATSPER et exerce une activation directe des influx de Ca^{2+} [114].

Chez des patients présentant une absence de motilité des spermatozoïdes ou une mobilité inférieure au seuil normal, un faible nombre de spermatozoïdes, une augmentation des spermatozoïdes anormalement structurés et un volume de sperme réduit, 2 mutations homozygotes non - sens de type insertion ont été identifiées dans le gène *CATSPER1* : c.539-540insT et c.948-949insATGGC, entraînant des décalages de cadre de lecture et des codons d'arrêt prématuré entraînant soit une protéine tronquée dépourvue de tous les domaines transmembranaires et du pore du canal soit l'absence complète de la protéine en raison d'une désintégration induite par le non-sens. Ceci empêche l'influx de calcium dépendant de CATSPER nécessaire aux processus de motilité et d'hyperactivité des spermatozoïdes [115].

Chez des hommes infertiles asthénozoospermiques, des délétions d'exons du gène *CATSPER2* (situé sur le chromosome 15) ont été identifiées [115, 116] ; Toutefois, à ce jour, aucune mutation n'a été identifiée dans les autres sous-unités formant les pores (CATSPER3 et CATSPER4), ni dans les sous-unités auxiliaires.

d- Les anomalies du gène *SLC26A8*

Le canal CFTR se situe dans le segment équatorial de la tête et dans la pièce intermédiaire du flagelle du spermatozoïde. Il est indispensable pour les processus de motilité et de capacitation des spermatozoïdes car il est nécessaire pour l'AMPC et l'augmentation du pH intracellulaire. Des influx de Cl⁻ médiés par le CFTR sont également nécessaires pour l'inhibition du canal sodique épithélial (ENaC) et pour l'hyperpolarisation de la membrane du spermatozoïde lors de sa capacitation.

Le gène *SLC26A8* code pour un transporteur d'anions monovalents et/ou divalents situé également dans le segment équatorial de la tête et dans l'annulus des spermatozoïdes. Ce transporteur interagit physiquement avec CFTR formant des complexes pour stimuler l'activité de transport du canal CFTR représenté par des flux de chlorure et de bicarbonate nécessaires à la motilité et à la capacitation des spermatozoïdes [117].

Chez des hommes présentant une asthénozoospermie, 3 mutations faux-sens hétérozygotes du gène *SLC26A8* ont été identifiés dont p.Glu812Lys et p.Arg954Cys. Ces mutations, localisées dans la première boucle extracellulaire et dans la région carboxy-terminale intra-cytoplasmique causent une diminution de la quantité ou une localisation erronée de la protéine SLC26A8, induisant une instabilité et une dégradation du complexe SLC26A8-CFTR par le protéasome, et arrêtent par conséquent la stimulation de CFTR, altérant la capacitation et l'activation de la motilité des spermatozoïdes [118].

En outre, chez un patient porteur de la mutation hétérozygote p.Glu812Lys, une organisation anormale mitochondriale dans la pièce intermédiaire a été notée.

2.3- L'échec d'activation des ovocytes

Lors de la fécondation, l'activation des ovocytes repose sur la libération par les spermatozoïdes du «facteur spermatique», qui déclenche une signalisation spécifique constituée d'oscillations de Calcium. L'activation des ovocytes se termine par l'expulsion du 2^{ème} globule polaire. La phospholipase C Zeta 1 spécifique des spermatozoïdes est apparue comme le médiateur de l'activation de l'ovocyte. Elle est codée par le gène *PLCZ1* situé sur le chromosome 12. Chez des patients porteurs d'un syndrome d'échec de l'activation de l'ovocyte pur, une mutation homozygote de PLCZ1 a été identifiée [119]. Chez un homme stérile présentant une capacité réduite d'induction d'oscillations de Calcium 2 mutations de PLCZ1 ont été identifiées (hétérozygote composé) [120]. Cette mutation altère le trafic des protéines,

conduisant à une signalisation calcique défectueuse et à une altération du développement embryonnaire précoce.

De plus, la réduction ou l'absence de la protéine PLCZ1 pourrait être secondaire à l'absence ou à la malformation de l'acrosome, ce qui augmenterait le nombre d'anomalies potentiellement responsables d'échec de l'activation de l'ovocyte, en particulier la globozoospermie [103]. La recherche d'une mutation de PLCZ1 ne devrait donc être effectuée que sur des patients avec échec de l'activation de l'ovocyte sans anomalie morphologique majeure associée telle que la globozoospermie.

3- L'épigénome et infertilité masculine

En pratique, en dehors des rares cas où le phénotype spermatique suggère un défaut génétique particulier, le bilan génétique de routine des patients infertiles se résume à la recherche des causes les plus fréquentes, à savoir les causes chromosomiques et les anomalies du chromosome Y. À l'heure actuelle, En raison du très grand nombre de gènes impliqués dans la spermatogenèse, même après un bilan diagnostique complet, l'étiologie de l'insuffisance testiculaire primitive reste inconnue dans plus de la moitié des cas [2].

Devant une infertilité masculine sévère, on dispose d'un outil thérapeutique efficace, l'intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Cette technique obtient dans plus de 98 % des cas une fécondation totale ou partielle de la cohorte d'ovocytes obtenus après hyperstimulation ovarienne. Mais comme pour la fécondation in vitro (FIV) simple, l'obtention d'un embryon clivé ou même d'un blastocyste n'est pas synonyme de grossesse évolutive ou de naissance d'un enfant en bonne santé. Se pose alors la question de la cause de l'infertilité du patient, de la qualité de ses gamètes et de leur impact non pas sur le processus de fécondation en lui-même, mais sur la viabilité du conceptus.

Un grand nombre de facteurs environnementaux, liés ou non au mode de vie, ont été impliqués dans l'apparition de pathologies chez l'homme. Il s'agit en majorité de pathologies chroniques, non transmissibles, évitables et représentant une proportion croissante des dépenses de santé.

Bien que certains polymorphismes génétiques soient associés à une augmentation du risque de maladies ayant une part environnementale, l'observation de phénotypes dissemblables chez des individus de même génotype exposés à un environnement différent ne peut être expliquée par la génétique formelle ou « hérédité mendélienne ». De plus, les études d'association pangénomique ont montré que la proportion de ces maladies explicables par des mutations de la séquence nucléotidique était la plupart du temps inférieure à 1 % et ne pouvait expliquer l'augmentation très importante de leur incidence au cours des dernières décennies [121].

En plus de l'ADN, certaines molécules représentent un niveau supplémentaire d'information. Celles-ci se surajoutent à la séquence nucléotidique en y apposant des marques, soit directement au niveau de la molécule d'ADN, soit au niveau de la chromatine associée, soit plus récemment en interagissant avec les ARN messagers (ARNm). Ces marques peuvent moduler l'expression du génome au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel et sont appelées marques « épigénétiques » ou épigénome. L'épigénétique est donc le domaine d'étude des modifications d'activité des gènes n'impliquant pas de modification dans leur séquence nucléotidique. Elle permet d'expliquer comment un même génotype peut aboutir à des phénotypes différents par l'intermédiaire de facteurs environnementaux modifiant l'épigénome. On parle alors d'épiphénotype lié à des épimutations [122].

Certaines marques épigénétique peuvent moduler la transcription d'un gène, comme la méthylation de l'ADN en position 5' d'une cytosine précédant une guanosine (dinucléotide CpG), et les modifications post-traductionnelles des

histones, principalement méthylation et acétylation, mais aussi phosphorylation, ubiquitylation, sumoylation, déamination ou ADP ribosylation.

Un autre mécanisme de régulation épigénétique de l'expression des gènes agit principalement au niveau post-transcriptionnel et implique des molécules d'ARN non codants, en particulier les micro-ARN (miARN) [122].

Des anomalies de l'épigénome ont par ailleurs été observées dans de nombreuses pathologies humaines pour lesquelles un déterminisme environnemental existe, en particulier le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'obésité et le diabète, des maladies neuropsychiatriques ou auto-immunes, ou encore des troubles endocriniens. Elles sont aussi impliquées dans les phénomènes de vieillissement et de sénescence [122]. Bien que les rares mutations génétiques sus-décrits puissent expliquer certains cas d'infertilité masculine [123], de récentes découvertes amènent à penser que des dérégulations de l'épigénome pourraient aussi être impliquées.

Des recherches suggèrent que l'exposition d'une génération donnée d'individus à des facteurs environnementaux peut avoir des conséquences non seulement sur la santé de cette génération et celle de ses enfants, mais aussi pour la santé des générations suivantes non exposées. Lorsque l'effet persiste chez les générations non exposées au facteur environnemental, que ce soit au niveau de leurs cellules somatiques ou des cellules germinales de leurs parents, on parle alors d'héritabilité trans-générationnelle de phénotypes induits par l'environnement [121]. Cependant, les facteurs environnementaux mutagènes sont relativement peu nombreux. La principale hypothèse permettant de comprendre comment l'exposition parentale à des facteurs environnementaux peut se répercuter sur la descendance sans modifications du génome est l'existence de modifications au niveau des gamètes de l'épigénome et donc héritables.

L'héritabilité épigénétique transgénérationnelle est définie comme une transmission par les gamètes d'une information épigénétique entre les générations en l'absence de toute exposition directe ou de manipulations génétiques [121].

3.1- Les troubles de méthylation de l'ADN

Au cours des mitoses successives des cellules somatiques, l'épigénome reste très stable. Cependant, sa transmission intergénérationnelle est modulée, effaçant ainsi la grande majorité des marques épigénétiques. Une première vague d'effacement a lieu lors du développement embryonnaire préimplantatoire, et participe à l'acquisition de la totipotence des cellules embryonnaires, phénomène indispensable au développement de l'embryon et du fœtus. Pendant cette réinitialisation, le génome paternel est activement déméthylé contrairement au génome maternel qui est passivement déméthylé. Néanmoins, certaines marques épigénétiques persistent, en particulier au niveau de gènes dits soumis à l'empreinte parentale, c'est à dire dont les deux allèles sont méthylés différemment lors de la gaméto-genèse selon leur origine paternelle ou maternelle. Aussi, de nombreux autres gènes non soumis à l'empreinte parentale résistent à cette vague de déméthylation, constituant une part potentiellement héritable du méthylome [124].

Puis, de façon plus spécifique, au cours de la gaméto-genèse, les cellules germinales primordiales subissent une deuxième vague d'effacement qui réinitialise les marques épigénétiques sur les gènes soumis à l'empreinte parentale, avant une reprogrammation différente selon le sexe du conceptus par méthylation de novo de l'ADN de ces régions du génome, les DMR (differentially methylated regions), constituant « l'empreinte parentale » héritable [124]. L'altération du profil de méthylation des gènes soumis à empreinte est donc particulièrement intéressante pour la qualité du conceptus.

Dans le cadre de l'infertilité masculine, une épimutation spermatique au niveau de DMR pourrait alors être transmise à la descendance. Une telle transmission a déjà été décrite et pourrait être plus fréquente en présence d'une mutation d'un gène codant pour une enzyme impliquée dans cette méthylation de novo [125].

Ces anomalies de la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes situées au niveau de régions soumises à l'empreinte parentale peuvent expliquer plusieurs cas d'infertilité masculine idiopathique. Par exemple, en cas d'anomalie de méthylation du gène soumis à l'empreinte paternelle *H19* au niveau de l'ADN Spermatique, le risque d'infertilité est 14,62 fois plus important avec une oligozoospermie. En cas d'anomalie de la méthylation du gène soumis à l'empreinte maternelle *MEST* au niveau de l'ADN Spermatique, le risque d'infertilité est 3,4 fois plus important avec une OATS [126].

Même pour les gènes non soumis à empreinte et particulièrement des gènes impliqués dans la spermatogenèse et la spermiogénèse, leurs anomalies de méthylation sont associées à des altérations des paramètres spermatiques. Par exemple :

- L'hyper méthylation du promoteur du gène *MTHFR* codant l'enzyme Methyl TetraHydroFolate Réductase, (impliquée dans le métabolisme des folates, la synthèse de l'ADN et les processus de méthylation de l'ADN et des histones), peut être responsable d'azoospermie sécrétoire, ou d'oligospermie ou même de patients normospermes mais infertiles. Elle serait aussi plus fréquente dans les spermatozoïdes des hommes partenaires de couples présentant des fausses couches spontanées à répétition idiopathiques [127].

- l'hyperméthylation du promoteur du gène *CREM*, (codant un facteur de transcription) entraîne une OATS et des altérations de la protamination du noyau spermatique [128].
- L'hyperméthylation du promoteur du gène *DAZL* (*Deleted in azoospermia-like*), un gène crucial pour le bon déroulement de la spermatogenèse, est plus fréquemment retrouvée chez les patients infertiles présentant une OATS que chez des témoins normospermiques [129].

Une hyper méthylation de plusieurs régions du génome de fonctions différentes peut altérer les paramètres spermatiques. De ce fait, un défaut des mécanismes d'effacement de la méthylation dans les cellules germinales primordiales pourrait être impliqué dans l'infertilité masculine.

3.2- Les anomalies du remplacement des histones par les protamines au cours de la spermiogénèse

Les spermatozoïdes sont les seules cellules capables de survivre en dehors de l'organisme producteur. Au cours de la spermiogénèse, ils subissent une réorganisation spectaculaire et unique de leur génome. Le fait marquant de cette différenciation post-méiotique est la disparition des nucléosomes, unités universelles d'organisation et d'empaquetage des génomes chez les eucaryotes. La disparition des histones, les constituants des nucléosomes, au cours de la spermiogénèse et leur remplacement par des petites protéines basiques non-histones, les protéines de transition et les protamines reliées entre elles par des ponts disulfures. Il existe 2 isoformes de protamines, P1 et P2, présents dans un ratio de 1:1 dans le noyau spermatique. Cette transformation globale de l'organisation du génome dans les cellules germinales mâles a comme objectif la compaction extrême de celui-ci avant le voyage du spermatozoïde afin d'assurer sa protection lors de cette période à risque pour son intégrité [130].

Toute perturbation affectant le remplacement des histones aboutit à une compaction défectueuse du génome dans le spermatozoïde et à une infertilité masculine. Le remplacement des histones est donc une étape critique pour la procréation et la perpétuation de l'espèce.

La vision classique est que les histones sont initialement remplacées par des protéines dites « de transition » elles-mêmes substituées, à leur tour, par les protamines.

Les protéines de transition sont nécessaires pour une compaction efficace du génome par les protamines ainsi que pour la maturation de la protamine 2 (Prm2). La protamine 2 est synthétisée sous la forme d'une pré-protéine qui subit un clivage protéolytique dans sa partie N-terminale lors de son assemblage [130].

Un variant de H2A nommé H2A.L.2 est exprimé au moment même du remplacement général des histones et serait nécessaire aux protéines de transition pour assurer leur fonction : l'incorporation de l'histone H2A.L.2 ouvre le nucléosome qui doit être préalablement hyper-acétylé, ce qui permet aux protéines de transition d'être chargées sur la chromatine et d'interagir avec les protamines tout en assurant la maturation du précurseur pré-Prm2. En l'absence de H2A.L.2, les protéines de transition ne peuvent pas entrer efficacement en interaction avec la chromatine et s'agrègent donc en piégeant une fraction des protamines qui ne peuvent pas être maturées ni assemblées. La conséquence de cette situation est un sous-dosage de protamines au niveau de l'ADN et une compaction défectueuse du génome [130].

Plus de 85 % des histones sont remplacées par les protamines. Ceci constitue en soi une réorganisation épigénétique majeure, d'autant plus que de façon physiologique, 5 à 15 % des histones ne sont pas remplacées par les protamines [131]. La persistance de ces histones dites « retenues » ne se fait pas au hasard dans le génome haploïde, mais permet de « préparer » des régions fonctionnellement importantes pour le développement embryonnaire à leur activation transcriptionnelle

future dans l'embryon. Les régions d'ADN concernées sont enrichies en promoteurs de gènes impliqués dans le développement embryonnaire, en cluster de gènes soumis à empreinte, en facteur de transcriptions et en gènes codant des miARN. Dans ces régions, certains gènes maintiennent des marques épigénétiques au niveau de ces histones dites « retenues » [131]. Ces histones conservent des modifications post-traductionnelles activatrices et inhibitrices au niveau des promoteurs des gènes concernés, telles que respectivement la triméthylation des résidus lysine en position 4 (H3K4me3) et en position 27 (H3K27me3) de l'histone H3. De plus, les histones retenues sont fortement acétylées, une caractéristique rencontrée au niveau de régions transcriptionnellement actives, ce qui n'est pas le cas dans le spermatozoïde humain. Cette hyperacétylation pourrait participer à l'expression correcte de gènes paternels après la fécondation [132].

Ces modifications constituent des marques épigénétiques, dans le sens où elles sont transmises à l'embryon et peuvent être reconnues spécifiquement par des protéines ou complexes de protéine régulant l'état de la chromatine et l'expression des gènes qui y sont associés.

Des altérations de la quantité et des modifications des histones retenues dans le noyau spermatique ont ainsi été associées à des altérations de la qualité des embryons obtenus en AMP [133].

Des anomalies de l'expression des protamines et/ou des mécanismes de remplacement des histones par les protamines ont été décrites. Des altérations du ratio P1/P2 et/ou des diminutions des niveaux d'expression de P2 ont été retrouvées chez des hommes infertiles. Les anomalies mises en évidence comprenaient une diminution de la numération, de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes, mais aussi une augmentation des anomalies de méthylation au niveau de gènes soumis à l'empreinte. Il existerait donc potentiellement un lien entre altérations de la méthylation et de la protamination.

Une protamination anormale du noyau spermatique a de plus été associée à une augmentation de la fragmentation de l'ADN, une diminution des capacités fécondantes ainsi qu'une diminution des taux de grossesses [134].

3.3- Les ARN non codants

Dans le spermatozoïde, de petits ARNs non codants : piwi-ARNs (interagissant avec les protéines PIWI) et micro-ARNs sont présents.

- Les piwi-ARNs (de 26 à 30 nucléotides) semblent impliqués dans la méthylation de novo de séquences d'ADN appelées transposons et auraient un rôle important dans l'élimination des ARNm lors des derniers stages de la spermiogenèse. Des variants génétiques des protéines associées aux piwi-ARNs ont été reliés à des altérations des paramètres spermatiques, en particulier à l'oligospermie [135].
- Les micro-ARNs (de 19 à 21 nucléotides) sont impliqués principalement dans des phénomènes d'inhibition post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Par un mécanisme de complémentarité de séquence, ces petits ARNs permettent la reconnaissance des régions 3' non traduites des molécules d'ARN messenger (ARNm) cibles par un complexe protéique effecteur entraînant la répression de la traduction de l'ARNm, soit par clivage de celui-ci, soit par inhibition de sa traduction.

Leur profil d'expression peut être modifié dans des conditions pathologiques. En effet, ils pourraient simplement représenter des rémanences d'événements ayant eu lieu lors de la spermatogenèse, de la maturation post-testiculaire et du transport des spermatozoïdes dans le tractus génital masculin. Lors de la fécondation, le contenu en ARN du spermatozoïde, y compris ces ARN non codants, est transmis à l'ovocyte et peuvent avoir une fonction de messenger épigénétique et participer au développement de l'embryon.

Ces petits ARNs semblent être de nouveaux biomarqueurs intéressants de l'infertilité masculine. L'expression d'un micro-ARN épидидymaire dans les spermatozoïdes, miR-27b, a été associée à la mobilité des spermatozoïdes et pourrait être impliquée dans les asthénospermies et les tératospermies idiopathiques. Des polymorphismes des gènes codant pour des enzymes clés de la voie des micro-ARNs ont été associés à des altérations des paramètres spermatiques, en particulier l'oligospermie [136].

Certains types d'épimutations peuvent entraîner d'autres épimutations. Ce serait par exemple le cas d'une épimutation concernant l'expression de miARN impliqués dans la régulation de l'expression d'ADN méthyl transférase ou d'enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles des histones.

3.4- Les analyses des anomalies épigénétiques du spermatozoïde

Le bilan de l'infertilité masculine peut être Complété par une évaluation du noyau des spermatozoïdes par quatre tests supplémentaires : l'analyse de l'aneuploïdie et l'estimation du risque de non-disjonction chromosomique, la fragmentation de l'ADN spermatique, la décondensation de la chromatine et l'indice de méthylation.

Indications : bilan d'infertilité inexplicée, échec de tentatives de FIV/ICSI (activation ovocytaire et blocage embryonnaire), échec d'implantation et avortement précoce.

a- L'index de méthylation

Technique : méthode sandwich avec anticorps anti-méthyle cytosine en double couche.

Principe : l'état de méthylation de la chromatine est l'un des régulateurs clés de la spermatogenèse. Son altération pourrait ainsi contribuer à des défauts d'expression des gènes au cours de la méiose et/ou de la maturation de spermatide et ainsi conduire à des paramètres spermatiques anormaux (faible numération, problème de mobilité, morphologie et vitalité).

b- La décondensation de la chromatine spermatique

Technique : bleu d'aniline.

Principe : la coloration en bleu des spermatozoïdes serait en rapport avec la persistance de nucléoprotéines riches en lysine responsables d'une condensation défectueuse de la chromatine.

L'analyse porte sur 200 spermatozoïdes. Un pourcentage de spermatozoïdes colorés est déterminé : un taux supérieur à 30 % est anormal, mais il n'y a pas de consensus sur le seuil limite ; cela invite le médecin à questionner sur la prise de toxiques possible (tabac par exemple)

c- L'index de Fragmentation de l'ADN Spermatique

Technique : TUNEL.

Principe : quantification de l'incorporation de nucléotides marqués aux extrémités 3'OH des fragments d'ADN grâce à une terminal désoxynucléotidyl transférase.

L'analyse porte sur 200 spermatozoïdes. Un pourcentage de spermatozoïdes marqués est déterminé : un taux supérieur à 30 % est anormal mais il n'y a pas de consensus.

3.5- Interactions de l'épigénome avec l'environnement

Des altérations de l'épigénome du spermatozoïde, peuvent être induites par l'environnement, être transmises et avoir un impact sur l'état de santé de la descendance. Plusieurs facteurs d'exposition environnementale sont incriminés : Régime alimentaire, polluants environnementaux, perturbateurs endocriniens, stress... [137].

Par exemple, la consommation d'alcool entraîne une hypométhylation de l'ADN spermatique au niveau de deux régions soumises à l'empreinte paternelle (H19 et IG-DMR) [138]. Par ailleurs, il a été démontré que le tabagisme modifie le niveau de méthylation au niveau d'un rétrotransposon dans le spermatozoïde [139].

Le tabagisme entraîne une altération du remplacement des histones par les protamines, aboutissant à une persistance anormale d'histones dans le noyau spermatique, ce qui, en soit, constitue une épimutation [140]. Dans les histones retenues, l'acétylation en position H4K8 et H4K12 est plus importante dans les spermatozoïdes de fumeurs que chez les sujets non-fumeurs [141]. Enfin, Une étude des spermatozoïdes humains éjaculés a retrouvé que 28 miARN liés à des pathologies du système reproductif étaient différentiellement exprimés chez des tabagiques normospermiques par rapport aux contrôles non tabagiques [142].

Chez l'homme, des stratégies visant à diminuer le risque d'altération de l'épigénome spermatique, ou à corriger certains facteurs environnementaux ont montré très récemment leur intérêt sur l'épigénome, et soutiennent l'idée d'une correction possible des facteurs de risque épigénétiques avant la conception. En effet, l'exercice physique entraîne une modification du méthylome spermatique après seulement un cycle de spermatogenèse [143].

Il est possible qu'une hygiène de vie et des traitements de supplémentation vitaminique ou antioxydants améliorent les paramètres de l'intégrité du génome du spermatozoïde.

II- Les causes pré-testiculaires de l'infertilité masculine

1- Généralités

L'infertilité d'origine génétique et de mécanisme pré-testiculaire se rencontre dans l'hypogonadisme hypo gonadotrope congénital (HHC), causé par un déficit de production, de sécrétion ou d'action de l'hormone GnRH [17].

L'HHC isolé (c'est-à-dire que le reste de la fonction de l'anté-hypophyse est normal) reste une cause rare d'azoospermie et se caractérise par une infertilité rarement isolée, mais le plus souvent associée à une puberté absente ou incomplète (initiée puis arrêtée) évocatrice du diagnostic.

La puberté retardée est définie par l'absence d'augmentation du volume testiculaire à l'âge de 14 ans (volume <4 ml) [144]. Il est difficile de faire la différence entre le retard constitutionnel de la croissance et de la puberté [RCCP]) et l'HHC partiel, notamment au début de l'adolescence entre 13 et 16 ans.

Il est obligatoire de rechercher les anomalies du développement associées telles que la cryptorchidie avec ou sans micropénis, et les signes évocateurs d'un déficit combiné en hormone hypophysaire.

Parfois, l'HHC s'associe à d'autres anomalies du développement comme une fente labiale ou palatine, une agénésie dentaire, une anomalie de l'oreille, une déficience auditive congénitale, une agénésie rénale, une synkinésie bimanuelle ou des anomalies du squelette. Lorsqu'elle est associée à une anosmie ou à une hyposmie, l'HHC est appelée syndrome de Kallmann. Elle résulte d'une anomalie de la migration embryonnaire des neurones à GnRH depuis leur origine dans la placode olfactive vers le cerveau antérieur [17]. Environ la moitié des patients atteints d'HHC ont un syndrome de Kallmann. Celui-ci a une incidence de 1 pour 10 000 naissances. La plupart des patients atteints du syndrome de Kallmann présentent une hypoplasie et/ou une aplasie du bulbe olfactif en IRM cérébrale [146].

2- Les Formes de l'hypogonadisme hypo gonadotrope congénital

Déficit en GnRH et mauvais sens de l'odorat

- syndrome de Kallmann

Déficit isolé en GnRH (odorat normal)

Syndromes complexes, y compris HHC ou syndrome de Kallman

- déficit en hormone hypophysaire combiné
- dysplasie septo-optique

- syndrome de CHARGE : colobome, malformations cardiaques, atrésie de choane, retard de croissance et / ou de développement, malformations génitales et / ou urinaires, anomalies de l'oreille ou surdité ;
- hypoplasie congénitale avec HH
- syndrome de Waardenburg
- syndrome de Bardet – Biedl
- syndrome de Gordon Holmes
- Autres

3- La Génétique de l'HHC

L'HHC est génétiquement hétérogène, avec à la fois des cas sporadiques et familiaux.

Dans le syndrome de Kallmann, Plusieurs gènes mutés ont un impact sur le devenir et la migration des neurones à GnRH. Les mutations des gènes codant pour les protéines de la voie de signalisation de *FGF8* [147], du gène *CHD7* [148, 149] et du gène *SOX10* [150] affectent la niche neurogène dans la région nasale et altèrent le développement cranio-facial.

À l'inverse, la migration des neurones GnRH est influencée par :

- Le gène *ANOS1* codant pour L'anosmine 1 qui est une glycoprotéine des matrices extracellulaires embryonnaires exprimée de manière transitoire et localement restreinte impliquée dans la signalisation du FGF (facteur de croissance des fibroblastes) [151].
- le gène *PROK2* codant pour la prokinéticine-2;
- Le gène *PROKR2* codant pour le récepteur de la prokineticine 2 [152],
- Le gène *WDR11* [153],
- Le gène *SEMA3A* codant pour la sémaphorine 3A [154],
- Et le gène *FEZF1* [155],

Ailleurs, Les neurones sécrétant la kisspeptine subissent un processus dynamique de maturation prénatale et postnatale qui leur permet d'établir des connexions avec les neurones à GnRH au cours du développement précoce sous le contrôle des hormones stéroïdiennes. Les neurones producteurs de kisspeptine sont des afférences majeures des neurones à GnRH et sont essentiels pour différents aspects de la fonction de la GnRH, allant du rétrocontrôle de la GnRH et/ou de la sécrétion de gonadotrophine à la génération du pic pré-ovulatoire responsable de l'ovulation. Des mutations inactivatrices du gène *KISS1* codant pour la kisspeptine-1 et du gène *KISS1R* codant pour son récepteur empêchent le développement de la puberté [156].

De même, chez des patients atteints d'HHC ont été identifiés des mutations du gène *TAC3* codant la tachykinine-3, qui est clivée pour former la neurokinine-B, une protéine impliquée dans le contrôle des neurones à GnRH ; et des mutations du gène *TACR3* codant pour le récepteur de la tachykinine 3 ; (également appelé récepteur de la neuromédine-K [NKR]) [157].

Des mutations dans les protéines qui régulent l'ubiquitination, telles que la protéine 4 contenant le domaine OTU, codée par le gène *OTUD4* et la ligase d'ubiquitine-protéine E3; codée par le gène *RNF216* [158] , ainsi que dans des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, telles que l'estérase cible neuropathie codée par le gène *PNPLA6* [159] , ont été identifiées chez des patients atteints du syndrome de Gordon Holmes qui comporte en plus de l'HHC, une ataxie. Ainsi, les mutations dans ces 3 gènes donnent lieu à un syndrome neurodégénératif large et progressif incluant l'HHC.

L'haploinsuffisance du gène *DMXL2*, qui code la protéine synaptique DmX-like 2, provoque un syndrome complexe associant l'HHC à des déficits polyendocrines et polyneuropathies [160].

Les signaux périphériques qui transmettent des informations sur l'état métabolique modulent indirectement la neurosécrétion de GnRH. Cette modulation est bien illustrée par le phénotype d'absence de développement pubertaire et d'hypogonadisme hypogonadotrope chez les patients présentant des mutations inactivatrices du gène *LEP* codant pour la leptine ; ou du gène *LEPR* codant pour son récepteur. On pense que les effets de la leptine sur les neurones à GnRH se fait selon un mode d'action indirect puisque cette population neuronale n'exprime pas le récepteur de la leptine. Les cibles principales de la leptine pour la conduction de ses effets sur la reproduction comprennent probablement les neurones producteurs d'oxyde nitrique situés dans l'hypothalamus pré optique [161] et les circuits neuronaux situés dans le noyau pré-mammillaire ventral, qui pourraient transmettre des informations métaboliques aux neurones GnRH par des voies dépendantes et / ou indépendantes de la kisspepine.

À ce jour, plus de 25 gènes différents ont été impliqués dans le syndrome de Kallmann et/ou l'HHC, ce qui représente environ 50% des cas [147].

Plusieurs modes de transmission ont été identifiés :

1) Les gènes responsables du syndrome de Kallmann comprennent :

- Dans la forme récessive liée à l'X :

- ANOS1

- Dans la forme autosomique dominante :

- *FGFR1* codant le récepteur 1 du facteur de croissance des fibroblastes [162],

- *FGF8*,

- *CHD7*,

- *HS6ST1* codant pour l'héparane-sulfate 6-O-sulphotransférase 1 [163],

- *SOX10*,

- *SEMA3A*
- *WDR11*
- *IL17RD* codant pour le récepteur de l'interleukine-17 D
- **Dans la forme autosomique récessive :**

La fréquence de porteurs sains hétérozygotes dans la population générale est très faible

- *FEZF1*
- *PROKR2* ou *PROK2*, même s'il convient de noter que la plupart des patients porteurs de mutations dans ces gènes sont porteurs de ces mutations à l'état hétérozygote.

2) Les gènes impliqués dans l'HHC qui sont associés à un odorat normal comprennent :

- *GNRHR* codant pour le récepteur de GnRH [164],
- *KISS1R* [165],
- *GNRH1* codant pour l'hormone GnRH [166],
- *KISS1*
- *TACR3 et TAC3*.

Notant que des gènes tels que *FGFR1* ou *PROKR2* peuvent être mutés aussi bien chez les patients atteints du syndrome de Kallmann ou d'HHC isolée.

De manière remarquable, les mutations de ces gènes identifiées dans le syndrome de Kallmann ou dans l'HHC ne représentent que moins de 10% des cas [167].

Au cours des dernières années, la vision mendélienne traditionnelle de l'HHC en tant que trouble monogénique a été révisée à la suite de l'identification des formes oligogéniques de l'HHC. Ainsi, l'HHC causé par des mutations de *GNRHR* (un gène récessif) ; et le syndrome de Kallmann causé par des mutations du gène *ANOS1* sont très pénétrants [167], mais un tel schéma n'est pas observé

pour tous les gènes impliqués dans l'HHC et/ou le syndrome de Kallmann. L'examen des arbres généalogiques révèle une faible pénétrance pour la plupart des gènes de l'HHC et une expressivité variable chez les individus porteurs du même défaut génétique. Une telle observation a conduit à l'hypothèse que plusieurs gènes défectueux pourraient se synergiser pour produire un phénotype d'HHC plus sévère (c'est-à-dire d'oligogénicité) [168]. Au moins 20% des cas d'HHC sont oligogènes. En outre, des cas de régression à l'âge adulte (15%) suggèrent des interactions gène-environnement. Ce constat a modifié l'approche adoptée pour les tests et le conseil génétique des patients atteints d'HHC. Lorsque le patient porte plusieurs mutations dans différents gènes impliqués dans l'HHC ou dans le syndrome de Kallmann (c'est-à-dire, l'oligogénicité), le conseil génétique est difficile et le risque de transmission est variable [167].

Les tests génétiques sont utiles pour le diagnostic, le pronostic et le conseil génétique [167]. La première étape dans la hiérarchisation des gènes pour les tests génétiques consiste à établir le schéma de transmission.

Les tests génétiques peuvent également être guidés par la présence de caractéristiques phénotypiques supplémentaires :

- **Une fente labiale et/ou palatine et des anomalies du squelette** indiquent des mutations dans les gènes codant pour les composants de la voie de signalisation du FGF8 (par exemple, FGFR1, FGF8 et HS60ST1).
- Les signes associés au **syndrome de CHARGE** (CHARGE : Colobome, malformations Cardiaques, Atrésie de choane, retard de croissance et/ou de développement, anomalies Génitales et / ou urinaires, anomalies de l'Oreille et / ou surdité) favorisent le dépistage des mutations dans CHD7.
- De même, l'association d'HHC avec une **déficiencia auditive congénitale** devrait orienter le dépistage vers *CHD7*, *SOX10* et/ou *IL17RD*.

- La synkinésie bimanuelle ou l'agénésie rénale sont des indices cliniques importants évoquant des mutations d'*ANOS1*
- L'obésité morbide à début précoce, associée à l'HHC suggèrent des mutations du *LEP*, du *LEPR* ou de *PCSK1*.

En effet, la combinaison d'HHC avec des phénotypes associés spécifiques peut augmenter la probabilité de trouver des mutations causales par séquençage ciblé de gènes (Figure 33).

L'HHC accompagnée d'autres caractéristiques syndromiques telles que l'ichtyose congénitale ou la sphérocytose suggère un syndrome de gène contigu pour lequel une analyse par caryotype ou une CGH-array pourrait être utile pour identifier les anomalies chromosomiques sous-jacentes [169].

Enfin, l'avènement du séquençage de nouvelle génération a commencé à démêler la base moléculaire complexe de l'HHC et améliorera probablement le diagnostic génétique moléculaire de l'HHC. Plus précisément, cette technologie aidera à identifier les cas d'oligogénicité et pourrait promouvoir des approches personnalisées du conseil génétique.

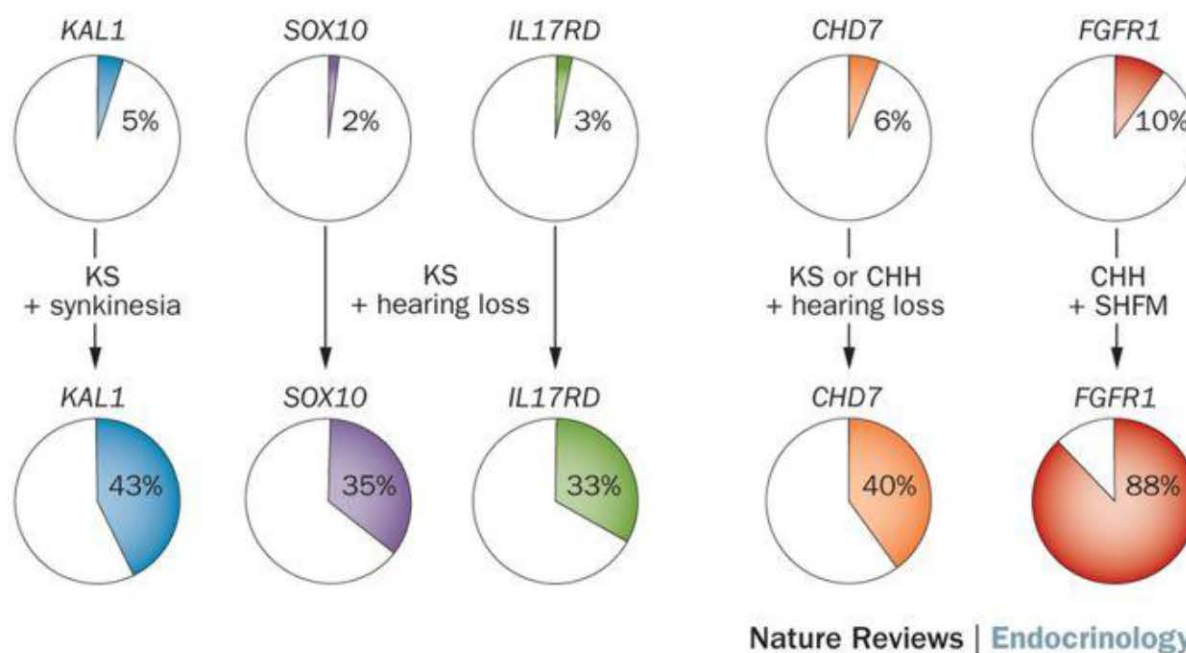


Figure 33 : Les phénotypes combinés peuvent faciliter l'identification du gène causal dans l'HHC.

(SHFM : split-hand/foot malformation)

4- Traitement de l'HHC

l'HHC est l'une des rares causes traitables de l'infertilité masculine. La spermatogenèse peut être induite soit par l'administration à long terme de GnRH (pompe), soit plus communément par des injections sous-cutanées de gonadotrophine (2 à 3 fois par semaine). La majorité des patients atteints d'HHC développent des spermatozoïdes dans leur éjaculat après une thérapie à long terme [170].

Il existe des facteurs prédictifs de l'évolution de la fécondité. Premièrement, la cryptorchidie indique un pronostic de fertilité médiocre. Les hommes atteints d'HHC qui ont une cryptorchidie ont souvent besoin d'un traitement prolongé (18-24 mois). Le volume testiculaire prépubère (<4 ml) et/ou les faibles taux sériques d'inhibine B sont également des déterminants négatifs de l'évolution de la fertilité [170].

Les cliniciens doivent savoir qu'avec un traitement à long terme, environ 75% des hommes développent des spermatozoïdes, mais qu'ils atteignent rarement la normale. Cependant, une caractéristique importante des patients atteints d'HHC est que de faibles concentrations de sperme n'excluent pas la fertilité.

Pour les hommes atteints d'HHC, dont le nombre ou la qualité des spermatozoïdes sont gravement altérés, les traitements par techniques de procréation médicalement assistée

Une fois la grossesse achevée, les hommes atteints d'HHC peuvent suivre une thérapie de remplacement à la testostérone (préparations injectables ou transdermiques) pour un traitement à long terme.

Le traitement doit être poursuivi jusqu'au premier trimestre de la grossesse, afin de maintenir la capacité de fertilité masculine en cas de fausse couche. En outre, bien que les cycles antérieurs des gonadotrophines semblent réduire le délai de la fertilité dans les traitements ultérieurs, la fertilité future n'est pas garantie. la cryoconservation du sperme est donc recommandée une fois la fertilité atteinte.

Lorsque les enfants sont nés de parents atteints d'HHC, il faut rechercher des signes d'HHC chez les nouveaux nés de sexe masculin tel une cryptorchidie ou un micro pénis. Il faut aussi quel que soit le sexe du nouveau né, surveiller Les taux de FSH sériques (l'indicateur le plus sensible de l'HHC) à l'âge de 4 à 8 semaines. Les hormones de la reproduction pendant la mini-puberté et si des mutations ont été identifiées chez les parents, il faut réaliser le test génétique [171].

III- Les causes obstructives post-testiculaires :

1 – Les anomalies du gène *ABCC7* [172]

En cas d'absence des canaux déférents, une échographie rénale est nécessaire car s'il existe une agénésie rénale associée, il s'agit plutôt d'une malformation ipsilatérale de tout le système Wolfien. En l'absence d'anomalie rénale, un bilan génétique doit être établi à la recherche de mutation du gène *ABCC7* codant pour le canal CFTR qui se trouve dans la membrane apicale des cellules épithéliales tapissant les glandes exocrines. L'absence de ce canal entraîne un déséquilibre des concentrations en ions à travers la membrane cellulaire. En conséquence, les fluides sécrétés par ces glandes deviennent plus visqueux et, à la fin, les conduits deviennent encombrés et s'atrophient.

Les maladies causées par des mutations du gène *ABCC7* sont autosomique récessives. L'absence d'une protéine fonctionnelle due à la présence sur les 2 allèles de mutations sévères supprime la fonction protéique et conduit à la mucoviscidose, tandis que la présence d'une mutation «mineure» préservant une fonctionnalité de canal associée à un autre allèle léger ou sévère donne lieu à ce qui a été décrit comme étant un trouble lié à CFTR. Les principaux troubles liés à CFTR sont la pancréatite, la bronchectasie et l'absence unilatérale ou bilatérale des canaux déférents (ou des épидидymes) (ABCD). Ce trouble est retrouvé chez 1 à 2% des patients en situation d'infertilité et chez 15 à 30% des patients porteurs d'une azoospermie obstructive.

Presque, tous les patients atteints de mucoviscidose présentent une ABCD, tandis que les autres patients présentant des mutations plus légères, peuvent présenter un ou plusieurs des syndromes décrits dans les troubles liés à CFTR. Comme les autres syndromes liés au CFTR, l'ABCD est causée par un épaissement du mucus et une stagnation menant à des infections et finalement à une atrésie. La disparition du canal déférent survient probablement pendant la petite enfance ou

l'enfance et est donc probablement rarement congénitale. Plus de 2000 mutations du gène CFTR ont jusqu'à présent été décrites (<http://www.genet.sickkids.on.ca/Home.html> et <http://cftr2.org/>).

Il est essentiel de rechercher des mutations *ABCC7* chez un homme atteint d'ABCD et chez son épouse afin d'évaluer le risque de donner naissance à un enfant atteint de mucoviscidose. Si les deux parents sont porteurs, un diagnostic pré-implantatoire, voire prénatal doit être proposé pour éviter la naissance d'enfants atteints de mucoviscidose. À noter que l'absence de détection d'une anomalie du gène *ABCC7* n'élimine pas complètement la présence d'une mutation rare car seules les mutations les plus fréquentes sont recherchées

Le traitement de l'ABCD consiste en un prélèvement microchirurgical de spermatozoïdes sur la tête de l'épididyme afin de les utiliser en AMP.

2- Les mutations du gène *ADGRG2*

Chez environ 80% des hommes atteints d'ABCD, au moins une mutation du gène *ABCC7* est retrouvée [173], indiquant que l'origine de l'ABCD est inconnue dans au moins 20% des cas. Dans cette catégorie, 3 mutations différentes de type décalage de cadre de lecture dans le gène *ADGRG2* chez 15% des patients testés [174].

Le gène *ADGRG2* est situé sur le chromosome X, codant pour l'un des 33 récepteurs couplés à la protéine G de la classe d'adhérence et est spécifiquement exprimé dans les canaux efférents. Le test *ADGRG2* doit donc être envisagé chez les patients ABCD négatifs pour *ABCC7*.

IV- Tableau récapitulatif

Altération du spermogramme	catégorie de l'anomalie génétique	An. Génétique	Détail	Remarques
azoospermie oligo zoospermie	Anomalies chromosomiques	Syndrome de Klinefelter		4% des formes en mosaïque (oligozoospermie)
		47,XYY		Atteinte inconstante de la fertilité
		Homme 46,XX		Gène <i>SRY</i> absent dans 5%
		Anomalie du chromosome Y	Micro délétion des régions AZF	AZFa ou AZFb : Biopsie testiculaire contre - indiquée++
			Chr. Y isodicentrique, en anneau, i(Yp)	5% des anomalies du Chr Y
	Equilibrée	translocation robertsonienne ou réciproque, inversion	Cause également une maladie abortive et des malformations	
	CNV	délétion d'un segment de 100 kb sur Xp11.23	Gene critique : <i>SPACA5</i>	FACTEUR DE RISQUE de l'infertilité
		Délétion en 9p	Gene critique : <i>DMRT1</i>	
		Délétions / duplications du Chr Y	Région critique : tandem DYZ19	
		Duplication sur le chr 1		
	Autosomique récessif	gène <i>TAF4B</i>	Chr 18	mutation p.Arg611*
		gène <i>ZMYND15</i>	Chr 1	mutation p.Leu507fs*3
		gène <i>SYCE1</i>	Chr 10	mutation intronique c.197-2A>G
		gène <i>TEX15</i>	Chr 8	mutation non-sens p.Y710*
		gène <i>MCM8</i>	Chr 20	mutation intronique c.1954-1G>
gène <i>NPAS2</i>		Chr 2	Non confirmé	

		gène <i>FSHR</i>	Chr 2	Insensibilité à l'hormone FSH
		Gène <i>SRD5A2</i>	Chr 2p	Déficit en dihydrotestosterone
	Récessif lié à l'X	Gene <i>TEX11</i>		1% des azoospermies
		Gene <i>AR</i>		Insensibilité partielle aux androgènes
Dominant autosomique ou lié à l'X	Gènes <i>KLHL10</i> , <i>MTHFR</i> , <i>GSTM1</i> , <i>FSHB</i> , <i>NR5A1</i>		léger effet négatif	
Asthéno-térato-spermie	Spz à tête large multi flagellaires	gène <i>AURKC</i>	Chr 19	c. 144delC (88%) p.Y248 * (10,5%)
	Globozoo-spermie	gène <i>DPY19L2</i>	Chr 12	délétion homozygote de 200 Kb chez 75% des cas
		gène <i>SPATA16</i>	Chr 3	mutation homozygote (c. 848 G>A) : rare
	Spz acéphalique	gène <i>SUN5</i>		50% des patients
	dyskinésie ciliaire primaire	gènes <i>DNAAF1</i> , <i>DNAAF3</i> , <i>ZMYND10</i> , <i>DNAI2</i> , <i>HEATR2</i> , <i>RSPH1</i> , <i>RSPH4A</i> et <i>RSPH9</i>		Impliqués dans l'infertilité masculine
		Gènes <i>DNAAF2</i> , <i>DYX1C1</i> (<i>DNAAF4</i>), <i>LRRC6</i> , <i>DNAH5</i> , <i>DNAI1</i> et <i>HYDIN</i>		Asthenospermie sans anomalies morphologiques
		Gène <i>CCDC39</i>		Cause une oligo-asthénozoospermie avec pièce intermédiaire rétrécie et un flagelle raccourci
	Anomalies morphologiques multiples du flagelle du spermatozoïde	Gène <i>DNAH1</i>	Chr 3	Mutation responsable de 30% de ce phénotype
		Gène <i>CFAP43</i>		13% des cas
		Gène <i>CFAP44</i>		8% des cas
	Asthéno-	Gène <i>SEPT12</i>	Chr 16	Mutations p.Thr89Met (exon 3) et

	tératospermie			p.Asp197Asn (exon 6)
	Asthenospermie	Gène <i>CATSPER1</i>		mutations c.539-540insT et c.948-949insATGGC
		Gène <i>CATSPER2</i>	Chr 15	délétions d'exons
		Gène <i>SLC26A8</i>		Mutations hétérozygotes p.Glu812Lys et p.Arg954Cys
	échec d'activation de l'ovocyte	gène <i>PLCZ1</i>	Chr 12	Absence d'anomalies morphologiques majeure
Hypo gonadisme hypo gonadotrope congénital	syndrome de Kallmann	Gène <i>ANOS1</i>	récessif liée à l'X	synkinésie bimanuelle ou l'agénésie rénale
		Gènes <i>FGFR1, FGF8, CHD7, HS6ST1, SEMA3A, WDR11, SOX10</i> et <i>IL17RD</i>	Autosomique dominant	SOX10 et IL17RD : déficience auditive CHD7 : syndrome de CHARGE FGFR1, FGF8, HS6ST1 : fente labiale et/ou palatine et des anomalies du squelette
		Gènes <i>FEZF1, PROKR2, PROK2</i>	Autosomique récessif	
	Odorat normal	Gènes <i>GNRH1, GNRHR, KISS1, KISS1R, TAC3</i> et <i>TACR3</i>		
	Syndrome neuro dégénératif	Gènes <i>OTUD4, RNF216</i> et <i>PNPLA6</i>		
	Déficits polyendocrines et polyneuropathies	gène <i>DMXL2</i>	Chr 15q	
	Obésité	gènes <i>LEP</i> et <i>LEPR</i>		
	Azoospermie obstructive	gène <i>ABCC7</i>	Chr 7q	80% des patients ABCD
gène <i>ADGRG2</i>		Chr X	3% des patients ABCD	

CONCLUSIONS

ET PERSPECTIVES

La génétique de l'infertilité est un domaine relativement récent. En raison de l'incidence élevée de l'infertilité masculine et de l'utilisation fréquente de spermatozoïdes produits par une spermatogenèse inefficace pour concevoir des enfants par AMP, il est essentiel de mieux comprendre la physiopathologie de l'infertilité. Identifier les causes génétiques des azoospermies non-obstructives et des oligozoospermies sévères permettra de caractériser les troubles affectant les spermatozoïdes produits par ces hommes présentant ces anomalies, et aussi d'améliorer les traitements actuels, et fournira ainsi de précieuses informations sur les conséquences que ces défauts pourraient avoir sur la santé et le développement des générations futures nées par AMP avec des gamètes produits par une spermatogenèse gravement altérée.

Jusqu'à présent le principal test génétique recommandé pour les hommes diagnostiqués avec ABCD est l'analyse du gène *ABCC7*. Cependant, vu la rareté de ces troubles dans notre contexte marocain, ce test génétique n'est pas réalisé dans l'unité de génétique médicale du CHU de Fès.

À l'heure actuelle, seules des anomalies chromosomiques et des mutations sur le chromosome Y se sont avérées sans ambiguïté être des causes génétiques fréquentes de l'infertilité masculine non obstructive. Ces analyses sont disponibles dans notre unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU de Fès. Nous recommandons d'introduire l'analyse des mutations du gène *TEX11* vu leur responsabilité relativement fréquente dans l'infertilité masculine. Cependant, vu le pourcentage assez élevé des cas d'infertilité masculine adressés à notre unité et qui ne présentent aucune de ces anomalies, nous pensons que certaines cas présentent des anomalies non génétiques sous jacentes. Nous pensons que ces patients ont été sous explorés et nous recommandons de mettre en place un service d'embryologie médical, incluant l'AMP, assurant une prise en charge globale multidisciplinaire et coordonnée des patients infertiles.

Concernant la tératozoospermie, la grande majorité des phénotypes ne sont pas spécifiques et relèvent souvent du groupe assez large d'oligoasthénospermie. On comprend aisément que ce groupe est extrêmement hétérogène, tant en terme de gravité et de variations phénotypiques qu'en termes d'étiologie. Cette hétérogénéité a grandement entravé l'identification des gènes causaux. La caractérisation génétique est plus importante pour les cas les plus graves présentant des anomalies de près de 100% des spermatozoïdes. Dans notre contexte géographique et ethnique, certaines tératozoospermies monomorphes sont relativement fréquentes. Nous avons mis en place le test de recherche de la mutation la plus fréquente du gène *AURKC*. D'autres tests génétiques devront être développés pour compléter l'exploration d'autres tératozoospermies monomorphes.

Les progrès technologiques récents ont stimulé la recherche de gènes impliqués dans l'infertilité masculine. La cartographie de l'homozygotie à l'aide des SNP microarrays et, plus récemment, le séquençage de l'exome ont permis d'identifier un nombre croissant de défauts génétiques associés à divers types d'infertilité masculine. Le séquençage de l'exome peut maintenant être réalisé pour moins de 5000 dirhams. Les études portant sur de nombreuses cohortes de patients sont donc devenues abordables et permettront d'identifier rapidement des dizaines voire des centaines de nouvelles causes génétiques de l'infertilité masculine. Les progrès technologiques se poursuivent et le séquençage du génome entier (WGS) dépassera bientôt le séquençage de l'exome (WES). Un avantage important du WGS par rapport au WES est qu'il ne nécessite pas l'enrichissement de la séquence cible. Cette phase initiale de capture d'exon, nécessaire au séquençage de l'exome, introduit d'importants biais quantitatifs qui compliquent la détection des CNV. Avec le WGS, il sera non seulement possible d'identifier tous les défauts génétiques, quelle que soit leur position dans le génome, mais il sera également possible de détecter tous les CNV et de caractériser directement leur étendue et leur localisation. La génétique de l'infertilité connaîtra deux époques d'or successives, d'abord l'ère

exomique qui vient de commencer mais sera de courte durée (quelques années) avant d'être dépassée par une ère génomique où les variants génétiques restants, que les techniques antérieures n'ont pas pu détecter, seront mis au jour.

On peut s'attendre à ce que les phénotypes les plus graves soient causés par un défaut mendélien d'un seul gène qui sera finalement identifiable par un séquençage exome/génome. Il est probable que les cas moins graves auront également une origine génétique, mais ne sera pas la seule responsable du phénotype du patient : il y aura des cas de multigénisme ou des cas où la combinaison de défauts génétiques avec des facteurs environnementaux conduit à l'infertilité. Dans ces cas, il sera très difficile de déterminer de manière fiable les facteurs génétiques conduisant à l'infertilité. Néanmoins, cela pourrait ne pas être aussi critique car ces personnes sont capables de produire des gamètes fonctionnels qui peuvent être utilisés avec succès dans les traitements actuels d'AMP. Ce qui est important pour ces sujets est probablement de pouvoir identifier les gamètes présentant le meilleur potentiel de développement.

Le développement de méthodes d'analyse de l'épigénome spermatique de détection de spermatozoïdes porteurs d'épimutations « à risque » pourrait permettre de mieux expliquer les causes d'infertilité masculine jusqu'ici non identifiées et d'évaluer leur impact sur la descendance et surtout permettre de mieux appréhender le risque de transmission à la descendance d'une susceptibilité accrue à certaines pathologies. Plus important, une stratégie visant au cours des techniques d'AMP à sélectionner les spermatozoïdes dont l'épigénome n'est pas altéré pourrait alors s'avérer bénéfique pour exclure ces spermatozoïdes anormaux au cours des techniques d'AMP et sera bénéfique pour les résultats de l'assistance médicale à la procréation et pour la qualité du conceptus. De futures recherches sont nécessaires afin de comprendre les relations pouvant exister entre le génome, l'épigénome et l'environnement.

Enfin, le principal intérêt du diagnostic génétique sera contenu dans cette information : pouvons-nous obtenir une grossesse avec des spermatozoïdes produits portant cette anomalie génique particulière ? Et si oui, l'utilisation de ces spermatozoïdes pourrait-elle compromettre la santé du futur conceptus ?

En comparaison à d'autres maladies, la génétique de l'infertilité a commencé lentement. Il est maintenant temps de rattraper son retard.

RESUME

RESUME

Les aspects génétiques de l'infertilité masculine : expérience de l'unité de génétique médicale du CHU Hassan II de Fès : à propos de 118 cas

INTRODUCTION :

L'infertilité masculine a longtemps été négligée bien qu'elle soit responsable de la moitié des cas d'infertilité du couple.

L'infertilité masculine est définie par l'absence de conception après au moins douze mois de rapports sexuels non protégés, ces rapports doivent être normaux en fréquence et en qualité au sein d'un couple vivant régulièrement ensemble.

OBJECTIF DU TRAVAIL :

L'intérêt de cette étude est de mieux connaître le profil génétique de l'infertilité masculine dans notre contexte et de réaliser une revue récente de la littérature afin de réaliser des recommandations pour la prise en charge ultérieure de cette maladie.

MATERIEL ET METHODES

Nous avons réalisé une étude observationnelle descriptive et transversale d'une série de 118 patients adressés à l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique pour infertilité. Le recrutement des patients concerne une période de 10 ans, de septembre 2009 à Septembre 2019. Les patients ont bénéficié d'une consultation spécialisée et d'un ou de plusieurs tests génétiques disponibles dans notre unité : Caryotype métaphasique sur sang, recherche de la micro délétion de l'AZF, étude par hybridation in situ en fluorescence et un séquençage Sanger de l'exon 3 du gène *AURKC*.

RESULTATS

L'âge moyen à la consultation est de 38 ans. La majorité des patients consulte tardivement, avec une infertilité relativement ancienne de 6,6 ans en moyenne.

L'infertilité masculine est primaire chez 98% des cas. 97% présentait une anomalie primitive de la spermatogenèse. L'altération spermatique la plus fréquente est l'azoospermie avec 78,6 %. 81,6 % de nos patients ont une formule chromosomique normale et 18,4% d'entre eux ont un syndrome de klinefelter. Aucun patient ne présente de micro délétion AZF. Un patient avec de spermatozoïdes macrocéphales et multi-flagellaires présente une mutation homozygote c.144delC du gène *AURKC*.

CONCLUSION

En comparaison à d'autres maladies, la génétique de l'infertilité a commencé lentement. Il est maintenant temps de rattraper son retard. Les progrès technologiques récents, et notamment le séquençage de l'exome et du génome entier ont permis d'identifier un nombre croissant de défauts génétiques associés à divers types d'infertilité masculine. Le développement de méthodes d'analyse de l'épigénome spermatique pourrait aussi permettre de mieux expliquer les causes d'infertilité masculine jusqu'ici non identifiées.

ABSTRACT

The Genetic aspects of male infertility: experience of the medical genetics unit of the Hassan II university hospital of Fez: about 118 cases

INTRODUCTION:

Male infertility has long been neglected although it is responsible for half of the couple's cases of infertility.

Male infertility is defined by the absence of conception after at least 12 months of unprotected sex; this sexual intercourse must be normal in frequency and quality within a couple living regularly together.

OBJECTIVE OF THE STUDY:

The interest of this study is to better know the genetic profile of male infertility in our context and to conduct a recent review of the literature to make recommendations for the subsequent management of this disease.

MATERIAL AND METHODS

We performed a descriptive and cross-sectional observational study of a series of 118 patients referred to the Medical Genetics and Oncogenetics Unit for Infertility. The recruitment of patients concerns a period of 10 years, from September 2009 to September 2019. Patients have benefited from a specialized consultation and one or more genetic tests available in our unit: metaphase karyotype on blood, search for the AZF micro deletion, fluorescence in situ hybridization and Sanger sequencing of exon 3 of the *AURKC* gene.

RESULTS

The average age at the consultation is 38 years. The majority of patients consult late, with a relatively old infertility of 6.6 years on average. Male infertility is primary in 98% of cases. 97% had a primary abnormality of spermatogenesis. The most common spermatogenic alteration is azoospermia in 78.6%. 81.6% of our patients

have a normal chromosome formula and 18.4% of them have klinefelter syndrome. No patient has AZF micro deletion. one patient with macrocephalic and multi-flagellar spermatozoa has a homozygous c.144delC mutation of the *AURKC* gene.

CONCLUSION

In comparison to other diseases, the genetics of infertility started slowly. It is now time to catch up. Recent technological advances, including the sequencing of exome and the genome, have identified a growing number of genetic defects associated with various types of male infertility. The development of methods of analysis of the spermatid epigenome could also help to better explain the causes of male infertility hitherto unidentified.

ملخص :

الأبعاد الوراثية لعقم الذكور: تجربة وحدة علم الوراثة الطبية بالمركز الاستشفائي الجامعي الحسن

الثاني بفاس: بصدد 118 حالة

مقدمة: لقد أهملت حالة عقم الذكور لفترة طويلة رغم أنها مسؤولة عن نصف حالات العقم لدى الزوجين. إن عدم الخصوبة لدى الذكور تحدده غياب الحمل بعد اثني عشر شهراً على الأقل من الجماع الجنسي غير المحمي، والذي يجب أن يكون طبيعياً من حيث التكرار والجودة داخل زوجين يعيشان معاً بشكل منتظم.

هدف العمل: إن هدف هذه الدراسة هو تحسين فهم الصورة الوراثية لعقم الذكور في سياقنا وإجراء استعراض حديث

للمؤلفات من أجل تقديم توصيات بشأن التكفل بهذا المرض.

الحالات والأساليب :

لقد أجرينا دراسة وصفية ولحظية لسلسلة من 118 مريضاً يعانون من العقم وجهوا إلى وحدة علم الوراثة الطبية.

تغطي الدراسة فترة 10 سنوات، من سبتمبر 2009 إلى سبتمبر 2019. استفاد المرضى من استشارات متخصصة وكذلك

من تحليل وراثي أو أكثر متوفاً في وحدتنا: تحليل الصبغيات على دم، البحث عن فقدان دقيق لـ AZF، دراسة التهجين

الموقعي و دراسة التسلسل الأكسون 3 من مورثة AURKC بطريقة [سنجر]

النتائج

يبلغ متوسط العمر عند أول استشارة لطب الوراثة 38 سنة. وتتشير غالبية المرضى في سن متأخر، حيث يبلغ قدم

العقم 6,6 سنوات في المتوسط. وعقم الذكور أولي في 98 في المائة من الحالات. كما أن لدى 97% من الحالات مشكل أولي

في تكوين الحيوانات المنوية. الاختلال الأكثر شيوعاً هو إنعدام الحيوانات المنوية بنسبة 78.6%. 81.6% من مرضانا لديهم

صيغة كروموسومية طبيعية و 18.4% لديهم متلازمة كلينفيلتر. لا يوجد مرضى يعانون من الحذف الجزئي لـ AZF كما أننا

وجدنا طفرة في مورث AURK.. لدى مريض يعاني من وجود حيوانات منوية برأس كبير وأذيال متعددة.

الخاتمة

مقارنة بأمراض أخرى، بدأ علم الوراثة في العقم ببطء. والآن حان الوقت للحاق بالركب. وقد حددت أوجه التقدم

التكنولوجي التي حدثت مؤخراً، بما في ذلك تقنية الأكسون و تسلسل الجينوم بأكمله، عدداً متزايداً من العيوب الجينية المرتبطة

بأنواع مختلفة من عقم الذكور. ويمكن أيضاً أن يتيح تطوير أساليب تحليل epigenome للحيوانات المنوية تفسير أسباب عدم

خصوبة الذكور التي لم تحدد بعد على نحو أفضل.

BIBLIOGRAPHIE

- [1]: Spira A. Epidemiology of human reproduction. Hum Reprod 1986 ;1:111-5.
- [2] : Thonneau P, Marchand S, Tallec A, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). Hum Reprod 1991 ; 6 : 811-6.
- [3] : Hammamah et al., 1999). Hammamah S., Saliba E., Benhamed M., Gold F. 1999. Médecine et biologie de la reproduction. Ed Masson, 3-50.
- [4] : Chitour S. L'infertilité au Maghreb ; site :3cetudes.com - www.3cetudes.com
- [5] : Rouvière (H)., Delmas (A)., (1992).Anatomie humaine, descriptive topographique et fonctionnelle.Tome 2-Tronc. 13eme édition. Paris; Milan; Barcelone Bonn;Masson 1992:564-96
- [6]: the reproductive systems. The Mc Graw hill companies.
- [7] : Langman J. 1984. Developpement normal et pathologique. Edition Masson. Embryologie.
- [8] : www.embryology.ch
- [9]: Johnson, L., D.L. Thompson, Jr., and D.D. Varner, Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. Anim Reprod Sci, 2008. 105(1-2): p. 23-51.
- [10]: Skinner MK, Fritz IB Testicular peritubular cells secret a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions. Proc Natl Acad Sci USA 1985 ; 82 : 114- 118
- [11]. Imbeaud, S., et al., Molecular genetics of the persistent mullerian duct syndrome : a study of 19 families. Hum Mol Genet, 1994. 3(1): p. 125-31.
- [12]: Holstein, A.F., W. Schulze, and M. Davidoff, Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Reprod Biol Endocrinol, 2003. 1: p. 107.
- [13] : Satir, P, Christensen, ST. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* 2007: 69: 377- 400.

- [14]: Visconti, PE, Westbrook, VA, Chertihin, O, Demarco, I, Sleight, S, Diekman, AB. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 2002; 53 (1-2):133- 150.
- [15] : Xie, F, Garcia, MA, Carlson, AE et al. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol* 2006; 296 (2): 353- 362.
- [16]: Haider, S.G., Leydig cell steroidogenesis: unmasking the functional importance of mitochondria. *Endocrinology*, 2007. 148(6): p. 2581-2.
- [17]: Bianco, S. D. & Kaiser, U. B. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 569-576 (2009).
- [18]: DADOUNE J-P. Spermatogénèse : contrôle endocrine et regulation intragonadique. *Reproduction Humaine et Hormones*, 2000 XIII (2) : 119-128.
- [19] : Kuiri-Hanninen, T. et al. Increased activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in infancy results in increased androgen action in premature boys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 98-105 (2011).
- [20]: Valeri, C., Schteingart, H. F. & Rey, R. A. The prepubertal testis: biomarkers and functions. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 20, 224-233 (2013).
- [21]: Herman-Giddens, M. E. et al. Secondary sexual characteristics in boys: data from the Pediatric Research in Office Settings Network. *Pediatrics* 130, e1058-e1068 (2012).
- [22] : Robin G; Hypogonadisme masculin. *Andrologie-Médecine de la reproduction*. CHRU Lille 2011.
- [23] : Salvenave S., Droumaguet C., Néraud B., Chanson P., Young J., Les hypogonadismes hypogonadotropes acquis. *Med reprod*; 2007;9:329-36.

- [24] : Raivio T., Falardeau J, Dwyer A., Quinton R., Hyes FJ., Huges VA et al. Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 2007;357:863–73.
- [25]: Ravel C, Berhaut I, Siffroi J.–P. infertilités masculines. EMC, Endocrinologie–Nutrition, 10–032–E–10, 2009.
- [26] : Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril* 2001 ; 75: 237–48.
- [27] : VELDHUIS J., ZWART A., MULLIGAN T., IRANMANESH A. : Muting of androgen negative feedback unveils impoverished gonadotropin–releasing hormone/luteinizing hormone secretory reactivity in healthy older men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86, 529–535.
- [28] : Mieusset R, Bujan L, Mansat A, Pontonnier F. hyperthermie scrotale et infécondité masculine. *Progrès en urologie* 1992; 2: 31–6.
- [29] : Sepaniak S, Forge T, Fontaine B et al. Impact négatif du tabac sur la fertilité masculine : des spermatozoïdes à la descendance. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2004; 33 : 384–90.
- [30] : Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, et al. Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;140:3–11.
- [31]: Ku JH, Kim YH, Jeon YS, Lee NK. The preventive effect of systemic treatment with interferon–alpha2B for infertility from mumps orchitis. *BJU Int* 1999;84:839–42
- [32] : Goulet V, Laurent E, Semaille C. Augmentation du dépistage et des diagnostics d'infections à Chlamydia Trachomatis en France: analyse des données Rénachla 2007–2009. *BEH* 2011; 26–27–28: 316–20.
- [33]: Nevoux P, Robin G, Gonheim T, Boitrelle F, Rigot J–M, Marcelli F. Varicocèle et infertilité: mythe ou réalité? *Progrès en urologie* 2009; 19: 126–30.

- [34] : Hadziselimovic F. Early successful orchidopexy does not prevent from developing azoospermia. *Int Braz J Urol* 2006;32(5):570-3.
- [35] : Baker JA, Buck GM, Vena JE, Moysich KB. Fertility patterns prior to testicular cancer diagnosis. *Cancer Causes Control* 2005; 16: 295-9.
- [36] : Huyghe E, Matsuda T, Daudin M et al. Fertility after testicular cancer treatment results of a large multicenter study. *Cancer* 2004; 1000: 732-7.
- [37] : El-Helaly M, Awadalla N, Mansour M, El-Biomy Y. Workplace exposures and male infertility — a case-control study. *Int JOc-cup Med Environ Health* 2010;23:331-8
- [38] : Jarow J, Sigman M, Kolettis P et al. The optimal evaluation of the infertile male: Best practice statement revised. *American Urological Association* 2010: 1-33.
- [39]: WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen – 5th ed. WHO Press, 2010; p : 28,131.
- [40] : Guy L., Védrine N., exploration clinique et paraclinique du testicule. *EMC. Urologie*, 18-601-C-10; 2008
- [41] : MENKVELD R., WONG W.Y., LOMBARD C.J., et al. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod*, 2001, 16(6): p. 1165-71.
- [42] : BLANCHARD M., HAGUENOER K., APERT A., et al. Sperm morphology assessment using David's classification: time to switch to strict criteria? Prospective comparative analysis in a selected IVF population. *Int J Androl*, 2011, 34(2): p. 145-52.
- [43] : MENKVELD R., STANDER F.S., KOTZE T.J., et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod*, 1990, 5(5): p. 586-92.

- [44] : GUZICK D.S., OVERSTREET J.W., FACTOR-LITVAK P., et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*, 2001, 345(19): p. 1388–93.
- [45] : 5. Barthelemy C. Indications de la recherche des anticorps anti-spermatozoïdes. *Andrologie* 2003;13:70–80
- [46] : De Almeida M. Anticorps anti-spermatozoïdes : techniques de dépistage et interprétation des résultats. *Andrologie* 2003;13: 63–9.
- [47] : Peers MC. Analyse du Sperme. Tests fonctionnels. Faculté de Médecine Lille 2 DU d'Andrologie 2011.
- [48] : Arrêté du 11 avril 2008 modifié le 3 août 2010 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation. 2010.
- [49] : Sikaris K, McLachlan RI, Kazlauskas R, de Kretser D, Holden CA, Handelsman DJ. Reproductive hormone reference intervals for healthy fertile young men: evaluation of automated platform assays. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:5928–36
- [50] : Goullet E, Rigot JM, Blois N, Lemaitre L, Mazeman E. Intérêt de l'échographie scrotale systématique dans la prise en charge de l'homme infertile : étude prospective de 609 cas. *Progrès en urologie* 2000; 10: 78–82.
- [51] : Purohit RS, Wu DS, Shinohara K, Turek PJ. A prospective comparison of 3 diagnostic methods to evaluate ejaculatory duct obstruction. *J Urol* 2004;171:232–5.
- [52] : Matzuk, MM, Lamb, DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008: 14 (11): 1197– 1213.
- [53] : Huyghe E, Izard V, Rigot JM, Pariente JL, Tostain J. Evaluation de l'homme infertile : recommandations AFU 2007. *Prog Urol* 2008;18:95–101.

- [54]: Smyth CM, Bremner WJ. 1998. Klinefelter syndrome. *Arch Intern Med* 158:1309- 1314.
- [55]: Tuttelmann, F, Gromoll, J. Novel genetic aspects of Klinefelter's syndrome. *Mol Hum Reprod* 2010; 16 (6): 386- 395.
- [56] : Bauduceau.B, Mayaudon.H, Dupuy.O et Desangles.F ; Syndrome de klinefelter. Encyclopédie méd chir, Endocrinologie–nutrition, 10–032–E–20, 2001, 6p.
- [57] : Handel, MA. The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Exp Cell Res* 2004; 296 (1):57- 63.
- [58]: Ogawa Y., Yochida H. : Klinefelter syndrome; *Nippon Rinsho* ; 2004; vol.62 ;N°2, p :327–332.
- [59] : De Sanctis V, Ciccone S. 2010. Fertility preservation in adolescents with Klinefelter's syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev* 8:178–181.
- [60]: J.M. Limal: Syndrome de turner et de klinefelter: Diagnostic. *La revue de praticien*, 2000, vol.50;p :1011–1017.
- [61]: H .Okada, Hitoshi.F, Noboru.T,Masanori K., Yoshihiro.O, Masato.F, Minoru.H.,Osamu M., Kazuo G., Soichi A., S. Klinefelter syndrom in the male infertility clinic. *Human reproduction*; vol 14, n°4, pp 946–952. 1999.
- [62]: Matthew S. Wosnitter and Darius A. Paduch MD. *American journal of medical genetic part C (Seminars in in medical genetic)*; 163 c; 16–26; 2013.
- [63]: Ferlin A, Schipilliti M, Foresta C. 2011c. Bone density and risk of osteoporosis in Klinefelter syndrome. *Acta Paediatr* 100:878–884.
- [64] : L. Vignozzi, G. Corona, G. Forti, E.A. Jannini, M. Maggi. Clinical and therapeutic aspects of Klinefelter's syndrome: sexual function. *Molecular Human Reproduction*, Vol.16, No.6 pp. 418–424, 2010
- [65]: Corona G, Petrone L, Paggi F, Lotti F, Boddi V, Fisher A, Vignozzi L, Balercia G, Sforza A, Forti G et al. Sexual dysfunction in subjects with Klinefelter's syndrome. *Int J Androl* 2009a;32:1–8. 2009b;32:587–598.

- [66] : Boada R, Janusz J, Hutaff-Lee C, Tartaglia N. The cognitive phenotype in klinefelter syndrome: a review of literature including genetic and hormonal factors. *Dev Disabil Res Rev* 2009;15:284–94.
- [67]: Lahlou N, Fennoy I, Carel JC, Roger M. Inhibin B and anti-Müllerian hormone, but not testosterone levels, are normal in infants with nonmosaic Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89: 1864–8.
- [68] : L.Rocher, A.Giuria, V.Izard, S.Ferlicot, Y.Menu, : Syndrome de klinefelter : résultats de l'écho-doppler testiculaire chez 30 patients. *Journal de radiologie; EMC; 2007,p 1449.*
- [69] : Damien Sanlaville, Catherine Turleau. Types, fréquences et mécanismes de formation des anomalies chromosomiques. Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale
- [70]: Ferguson, KA, Wong, EC, Chow, V, Nigro, M, Ma, S. Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum Mol Genet* 2007: 16 (23): 2870– 2879.
- [71] : Luddi, A, Margollicci, M, Gambera, L et al. Spermatogenesis in a man with complete deletion of USP9Y. *N Engl J Med* 2009: 360 (9): 881– 885.
- [72] : Kichine, E, Roze, V, Di, CJ et al. HSFY genes and the P4 palindrome in the AZFb interval of the human Y chromosome are not required for spermatocyte maturation. *Hum Reprod* 2012: 27 (2):615– 624.
- [73] : Rozen, SG, Marszalek, JD, Irenze, K et al. AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 2012: 91 (5): 890– 896.
- [74]: Ayhan, O, Balkan, M, Guven, A et al. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. *J Med Genet* 2014: 51 (4): 239– 244.

- [75] : Maor-Sagie, E, Cinnamon, Y, Yaacov, B et al. Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2015: 32 (6): 887– 891.
- [76] : Okutman, O, Muller, J, Baert, Y et al. Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Hum Mol Genet* 2015: 24 (19): 5581– 5588.
- [77] : Tenenbaum-Rakover, Y, Weinberg-Shukron, A, Renbaum, P et al. Minichromosome maintenance complex component 8 (MCM8) gene mutations result in primary gonadal failure. *J Med Genet* 2015: 52 (6): 391– 399.
- [78] : Ramasamy, R, Bakircioglu, ME, Cengiz, C et al. Whole-exome sequencing identifies novel homozygous mutation in NPAS2 in family with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2015: 104 (2): 286– 291.
- [79]: Yatsenko, AN, Georgiadis, AP, Ropke, A et al. X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *N Engl J Med* 2015: 372 (22): 2097– 2107.
- [80]: Lopes, AM, Aston, KI, Thompson, E et al. Human spermatogenic failure purges deleterious mutation load from the autosomes and both sex chromosomes, including the gene DMRT1. *PLoS Genet* 2013: 9 (3): e1003349.
- [81] : Huang, N, Wen, Y, Guo, X et al. A screen for genomic disorders of infertility identifies MAST2 duplications associated with nonobstructive azoospermia in humans. *Biol Reprod* 2015: 93 (3): 61.
- [82] : Yatsenko, AN, Roy, A, Chen, R et al. Non-invasive genetic diagnosis of male infertility using spermatozoal RNA: KLHL10 mutations in oligozoospermic patients impair homodimerization. *Hum Mol Genet* 2006: 15 (23): 3411– 3419.

- [83] : Wei, B, Xu, Z, Ruan, J et al. MTHFR 677C>T and 1298A>C polymorphisms and male infertility risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012: 39 (2): 1997- 2002.
- [84]: Song, X, Zhao, Y, Cai, Q, Zhang, Y, Niu, Y. Association of the Glutathione S-transferases M1 and T1 polymorphism with male infertility: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2013: 30 (1): 131- 141.
- [85]: Tuttelmann, F, Laan, M, Grigorova, M, Punab, M, Sober, S, Gromoll, J. Combined effects of the variants FSHB -211G>T and FSHR 2039A>G on male reproductive parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 2012: 97 (10): 3639- 3647.
- [86]: Ferlin, A, Rocca, MS, Vinanzi, C, Ghezzi, M, Di, NA, Foresta, C. Mutational screening of NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in cryptorchidism and male factor infertility and functional analysis of seven undescribed mutations. *Fertil Steril* 2015: 104 (1): 163- 169.
- [87] : Hu, Z, Xia, Y, Guo, X et al. A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia. *Nat Genet* 2012: 44 (2): 183- 186.
- [88]: Massart, A, Lissens, W, Tournaye, H, Stouffs, K. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J Androl* 2012: 14 (1): 40- 48.
- [89]: Brahem, S, Mehdi, M, Elghezal, H, Saad, A. Study of aneuploidy rate and sperm DNA fragmentation in large-headed, multiple-tailed spermatozoa. *Andrologia* 2012: 44 (2): 130- 135.
- [90] : Dieterich, K, Soto, RR, Faure, AK et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* 2007: 39 (5): 661- 665.
- [91] : Ben Khelifa, M, Zouari, R, Harbuz, R et al. A new AURKC mutation causing macrozoospermia: implications for human spermatogenesis and clinical diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2011: 17 (12):762- 768.

- [92] : Ben, KM, Coutton, C, Blum, MG et al. Identification of a new recurrent aurora kinase C mutation in both European and African men with macrozoospermia. *Hum Reprod* 2012: 27 (11):3337- 3346.
- [93]: El, KF, Lamzouri, A, Laarabi, FZ, Zahi, M, Ben, AB, Sefiani, A. Confirmation of the high prevalence in Morocco of the homozygous mutation c.144delC in the aurora kinase C gene (AURKC) in the teratozoospermia with large-headed spermatozoa. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2011: 40 (4): 329- 333.
- [94] : Horst, A, Lens, SM. Cell division: control of the chromosomal passenger complex in time and space. *Chromosoma* 2014: 123 (1-2): 25- 42.
- [95]: Fellmeth, JE, Gordon, D, Robins, CE, Scott, RT, Treff, NR, Schindler, K. Expression and characterization of three Aurora kinase C splice variants found in human oocytes. *Mol Hum Reprod* 2015: 21 (8): 633- 644.
- [96] : Eloualid, A, Rouba, H, Rhaissi, H et al. Prevalence of the Aurora kinase C c.144delC mutation in infertile Moroccan men. *Fertil Steril* 2014: 101 (4): 1086- 1090.
- [97] : Fellmeth, JE, Ghanaim, EM. *Schindler K*. Hum Mol Genet: Characterization of macrozoospermia-associated AURKC mutations in a mammalian meiotic system, 2016.
- [98]: Coutton, C, Escoffier, J, Martinez, G, Arnoult, C, Ray, PF. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update* 2015: 21 (4): 455- 485.
- [99] : Achard, V, Paulmyer-Lacroix, O, Mercier, G et al. Reproductive failure in patients with various percentages of macronuclear spermatozoa: high level of aneuploid and polyploid spermatozoa. *J Androl* 2007: 28 (4): 600- 606.
- [100] : Harbuz, R, Zouari, R, Pierre, V et al. A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet* 2011: 88 (3): 351- 361.

- [101]: Ghedir, H, Ibala-Romdhane, S, Okutman, O, Viot, G, Saad, A, Viville, S. Identification of a new DPY19L2 mutation and a better definition of DPY19L2 deletion breakpoints leading to globozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2016: 22 (1): 35- 45.
- [102]: Zhu, F, Gong, F, Lin, G, Lu, G. DPY19L2 gene mutations are a major cause of globozoospermia: identification of three novel point mutations. *Mol Hum Reprod* 2013: 19 (6): 395- 404.
- [103] : Escoffier, J, Yassine, S, Lee, HC et al. Subcellular localization of phospholipase Czeta in human sperm and its absence in DPY19L2-deficient sperm are consistent with its role in oocyte activation. *Mol Hum Reprod* 2015: 21 (2): 157- 168.
- [104] : Dam, AH, Koscinski, I, Kremer, JA et al. Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet* 2007: 81 (4): 813- 820.
- [105] : Zhu, F, Wang, F, Yang, X et al. Biallelic sun5 mutations cause autosomal-recessive acephalic spermatozoa syndrome. *Am J Hum Genet* 2016: 99 (4): 942- 949.
- [106]: Yuan, S, Stratton, CJ, Bao, J et al. Spata6 is required for normal assembly of the sperm connecting piece and tight head-tail conjunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015: 112 (5): E430- E439.
- [107]: Horani, A, Brody, SL, Ferkol, TW. Picking up speed: advances in the genetics of primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Res* 2014: 75 (1-2): 158- 164.
- [108]: Imtiaz, F, Allam, R, Ramzan, K, Al-Sayed, M. Variation in DNAH1 may contribute to primary ciliary dyskinesia. *BMC Med Genet* 2015: 16: 14.
- [109] : Wambergue, C, Zouari, R, Fourati Ben, MS et al. Patients with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella due to DNAH1 mutations have a good prognosis following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2016: 31 (6): 1164- 1172.

- [110]: Mutations in CFAP43 and CFAP44 cause male infertility and flagellum defects in *Trypanosoma* and human *Nature communications*, Charles Coutton et al, (2018) 9:686, DOI: 10.1038/s41467-017-02792-7
- [111]: Baccetti, B, Collodel, G, Estenoz, M, Manca, D, Moretti, E, Piomboni, P. Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. *Hum Reprod* 2005: 20 (10): 2790- 2794.
- [112] : Kuo, YC, Shen, YR, Chen, HI et al. SEPT12 orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins. *J Cell Sci* 2015: 128 (5):923- 934.
- [113] : Kuo, YC, Lin, YH, Chen, HI et al. SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus. *Hum Mutat* 2012: 33 (4): 710- 719.
- [114] : Strunker, T, Goodwin, N, Brenker, C et al. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* 2011: 471 (7338): 382- 386.
- [115] : Avenarius, MR, Hildebrand, MS, Zhang, Y et al. Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *Am J Hum Genet* 2009: 84 (4): 505- 510.
- [116]: Avidan, N, Tamary, H, Dgany, O et al. CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet* 2003: 11 (7): 497- 502.
- [117] : Rode, B, Dirami, T, Bakouh, N et al. The testis anion transporter TAT1 (SLC26A8) physically and functionally interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel: a potential role during sperm capacitation. *Hum Mol Genet* 2012: 21 (6): 1287- 1298.
- [118] : Dirami, T, Rode, B, Jollivet, M et al. Missense mutations in SLC26A8, encoding a sperm-specific activator of CFTR, are associated with human asthenozoospermia. *Am J Hum Genet* 2013:92 (5): 760- 766.

- [119] : Escoffier, J, Lee, HC, Yassine, S et al. Homozygous mutation of PLCZ1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WW-binding protein PAWP. *Hum Mol Genet* 2016; 25 (5): 878- 891.
- [120] : Kashir, J, Konstantinidis, M, Jones, C et al. A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLCzeta) leads to male infertility. *Hum Reprod* 2012; 27 (1): 222- 231.
- [121] : Skinner MK. Endocrine disruptor induction of epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Mol Cell Endocrinol* 2014 ; 398 : 4-12.
- [122] : Chiang T-C, Su LJ. What Is Epigenetics?. In : Su LJ, Chiang TC, eds. *Environmental Epigenetics. Molecular and Integrative Toxicology*. London : Springer, 2015, p. 1-19.
- [123] : Hotaling J, Carrell DT. Clinical genetic testing for male factor infertility : current applications and future directions. *Andrology* 2014 ; 2 : 339-50.
- [124]: Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev* 2014 ; 28 : 812-28.
- [125]: Kobayashi H, Hiura H, John RM, et al. DNA Methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *European journal of human genetics*. *EJHG* 2009 ; 17 : 1582-91.
- [126]: Klaver R, Gromoll J. Bringing epigenetics into the diagnostics of the andrology laboratory : challenges and perspectives. *Asian J Androl* 2014 ; 16 : 669-74.
- [127]: Rotondo JC, Bosi S, Bazzan E, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene promoter hypermethylation in semen samples of infertile couples correlates with recurrent spontaneous abortion. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2012; 27 : 3632-8.
- [128]: Nanassy L, Carrell DT. Abnormal methylation of the promoter of CREM is broadly associated with male factor infertility and poor sperm quality but is improved in sperm selected by density gradient centrifugation. *Fertil Steril* 2011 ; 95 : 2310-4.

- [129] : Navarro–Costa P, Nogueira P, Carvalho M, et al. Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm. *Human Reproduction* (Oxford, England) 2010 ; 25 : 2647–54.
- [130] : Sophie Barral, Yuichi Morozumi, Naghmeh Hoghoughi, Sophie Rousseaux et Saadi Khochbin. Le mystère de la disparition des histones au cours de la spermatogenèse *Med Sci (Paris)*. Volume 33, Number 6–7, Juin–Juillet 2017. 588 – 590.
- [131] : Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009 ; 460 : 473–8.
- [132] : Schagdarsurengin U, Paradowska A, Steger K. Analysing the sperm epigenome : roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nat Rev Urol* 2012 ; 9 : 609–19.
- [133] : Aston KI, Punj V, Liu L, Carrell DT. Genome–wide sperm deoxyribonucleic acid methylation is altered in some men with abnormal chromatin packaging or poor in vitro fertilization embryogenesis. *Fertil Steril* 2012 ; 97 : 285–92.
- [134] : Francis S, Yelumalai S, Jones C, Coward K. Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Human Fertility* (Cambridge, England) 2014 ; 17(2) : 80–9.
- [135] : Gu A, Ji G, Shi X, et al. Genetic variants in Piwi–interacting RNA pathway genes confer susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese population. *Hum Reprod* 2010 ; 25 : 2955–61.
- [136] : Qin Y, Xia Y, Wu W, et al. Genetic variants in microRNA biogenesis pathway genes are associated with semen quality in a Han–Chinese population. *Reprod Biomed Online* 2012 ; 24 : 454–61.
- [137] : Pollet–Villard X, Rachel Lévy R. Modifications environnementales de l'épigénome du spermatozoïde et retentissement sur la descendance. *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 2015 ; 17 (4) : 264–80

- [138] : Ouko LA, Shantikumar K, Knezovich J, Haycock P, Schnugh DJ, Ramsay M. Effect of alcohol consumption on CpG methylation in the differentially methylated regions of H19 and IG-DMR in male gametes: implications for fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 2009 ; 33 : 1615–27.
- [139] : Consales C, Leter G, Bonde JP, *et al.* Indices of methylation in sperm DNA from fertile men differ between distinct geographical regions. *Hum Reprod* 2014 ; 29 : 2065–72.
- [140] : Yu B, Qi Y, Liu D, *et al.* Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm. *Fertil Steril* 2014 ; 101, 51–7.e1.
- [141] : Kim SK, Jee BC, Kim SH. Histone methylation and acetylation in ejaculated human sperm: effects of swim-up and smoking. *Fertil Steril* 2015 ; 103 : 1425–31.
- [142] : Marczylo EL, Amoako AA, Konje JC, Gant TW, Marczylo TH. Smoking induces differential miRNA expression in human spermatozoa: a potential transgenerational epigenetic concern? *Epigenetics* 2012 ; 7 : 432–9.
- [143] : Denham J, O'Brien BJ, Harvey JT, Charchar FJ. Genome-wide sperm DNA methylation changes after 3 months of exercise training in humans. *Epigenomics* 2015 : 1–15.
- [144] : Palmert, M. R. & Dunkel, L. Clinical practice. Delayed puberty. *N. Engl. J. Med.* 366, 443–453 (2012).
- [145] : Teixeira, L. *et al.* Defective migration of neuroendocrine GnRH cells in human arrhinencephalic conditions. *J. Clin. Invest.* 120, 3668–3672 (2010).
- [146] : Lewkowitz-Shpuntoff, H. M. *et al.* Olfactory phenotypic spectrum in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: pathophysiological and genetic implications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E136–E144 (2012).

- [147] : Miraoui, H. et al. Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 725–743 (2013).
- [148] : Marcos, S. et al. The prevalence of CHD7 missense versus truncating mutations is higher in patients with Kallmann syndrome than in typical CHARGE patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E2138–E2143 (2014).
- [149] : Balasubramanian, R. et al. Functionally compromised CHD7 alleles in patients with isolated GnRH deficiency. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111, 17953–17958 (2014).
- [150] : Pingault, V. et al. Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 707–724 (2013).
- [151] : Endo, Y., Ishiwata–Endo, H. & Yamada, K. M. Extracellular matrix protein anosmin promotes neural crest formation and regulates, FGF, BMP, and WNT activities. *Dev. Cell* 23, 305–316 (2012).
- [152] : Leroy, C. et al. Biallelic mutations in the prokineticin-2 gene in two sporadic cases of Kallmann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 865–868 (2008).
- [153] : Kim, H. G. et al. WDR11, a WD protein that interacts with transcription factor EMX1, is mutated in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 465–479 (2010).
- [154] : Kansakoski, J. et al. Mutation screening of SEMA3A and SEMA7A in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Pediatr. Res.* 75, 641–644 (2014).
- [155] : Kotan, L. D. et al. Mutations in FEZF1 cause Kallmann syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 95, 326–331 (2014).
- [156] : Topaloglu, A. K. et al. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N. Engl. J. Med.* 366, 629–635 (2012).

- [157] : Topaloglu, A. K. et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat. Genet.* 41, 354–358 (2009).
- [158] : Margolin, D. H. et al. Ataxia, dementia, and hypogonadotropism caused by disordered ubiquitination. *N. Engl. J. Med.* 368, 1992–2003 (2013).
- [159] : Topaloglu, A. K. et al. Loss-of-function mutations in PNPLA6 encoding neuropathy target esterase underlie pubertal failure and neurological deficits in Gordon Holmes syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E2067–E2075 (2014).
- [160] : Tata, B. et al. Haploinsufficiency of Dmxl2, encoding a synaptic protein, causes infertility associated with a loss of GnRH neurons in mouse. *PLoS Biol.* 12, e1001952 (2014).
- [161] : Bellefontaine, N. et al. Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. *J. Clin. Invest.* 124, 2550–2559 (2014).
- [162] : Pitteloud, N. et al. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 6281–6286 (2006).
- [163] : Tornberg, J. et al. Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 11524–11529 (2011).
- [164] : Layman, L. C. et al. Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nat. Genet.* 18, 14–15 (1998).
- [165] : de Roux, N. et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 10972–10976 (2003).

- [166] : Bouligand, J. et al. Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N. Engl. J. Med.* 360, 2742–2748 (2009).
- [167]: Au, M. G., Crowley, W. F. Jr & Buck, C. L. Genetic counseling for isolated GnRH deficiency. *Mol. Cell. Endocrinol.* 346, 102–109 (2011).
- [168] : Pitteloud, N. et al. Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Invest.* 117, 457–463 (2007).
- [169] : Vasson, A. et al. Custom oligonucleotide array-based CGH: a reliable diagnostic tool for detection of exonic copy-number changes in multiple targeted genes. *Eur. J. Hum. Genet.* 21, 977–987 (2013).
- [170] : Warne, D. W. et al. A combined analysis of data to identify predictive factors for spermatogenesis in men with hypogonadotropic hypogonadism treated with recombinant human follicle-stimulating hormone and human chorionic gonadotropin. *Fertil. Steril.* 92, 594–604 (2009).
- [171] : Chellakooty, M. et al. Inhibin A, inhibin B, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and sex hormone-binding globulin levels in 473 healthy infant girls. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3515–3520 (2003).
- [172] : Bombieri, C, Claustres, M, De Boeck, K et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* 2011: 10(Suppl. 2): S86– S102.
- [173] : Yu, J, Chen, Z, Ni, Y, Li, Z. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2012: 27 (1): 25– 35.
- [174] : Patat, O, Pagin, A, Siegfried, A et al. Truncating mutations in the adhesion G protein-coupled receptor G2 gene ADGRG2 cause an X-linked congenital bilateral absence of vas deferens. *Am J Hum Genet* 2016: 99 (2): 437– 442.

الأبعاد الوراثية لعقم الذكور : تجربة وحدة علم الوراثة الطبية
بالمركز الاستشفائي الجامعي الحسن الثاني بفاس
(بصدد 118 حالة)

الأطروحة

قدمت و نوقشت علانية يوم 2019/11/27

من طرف

السيدة بناني كنزة

لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات الأساسية

عقم الرجال - علم الوراثة - متلازمة كلينفلتر - فقدان جزئي AZF - مورثة AURKC

اللجنة

الرئيس	السيد مولاي عبد الإلاه ملهوف أستاذ في علم التوليد وأمراض النساء
المشرف	السيد كريم العظيم أستاذ في علم الوراثة
أعضاء	السيد جلال الدين العماري أستاذ في علم أمراض المسالك البولية
	السيدة الرغاي سناء أستاذة في علم التوليد وأمراض النساء
	السيدة سناء بنيس أستاذة في بيولوجيا الخلية