



**HAL**  
open science

# Profil de quelques éléments minéraux, du stress oxydatif et des vitamines (A, D, E) du plasma séminal des azoospermes

Marie-Florence N'Guessan

## ► To cite this version:

Marie-Florence N'Guessan. Profil de quelques éléments minéraux, du stress oxydatif et des vitamines (A, D, E) du plasma séminal des azoospermes. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Félix Houphouët Boigny (Côte d'Ivoire), 2017. Français. NNT: . tel-04178243

**HAL Id: tel-04178243**

**<https://hal.science/tel-04178243>**

Submitted on 7 Aug 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE  
*Union-Discipline-Travail*

Ministère de l'Enseignement supérieur  
et de la Recherche Scientifique



Laboratoire de  
Pharmacodynamie-Biochimique

Année Universitaire  
2016 - 2017

# THESE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de  
l'Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY

En Biotechnologie - Biosécurité - Bioressources

**Spécialité : Biologie Fonctionnelle et Moléculaire**  
**Option : Biologie de la Reproduction**

Mlle N'GUESSAN Marie-Florence

Numéro d'ordre  
2066/2017

## PROFIL DE QUELQUES ELEMENTS MINERAUX, DU STRESS OXYDATIF ET DES VITAMINES (A, D, E) DU PLASMA SEMINAL DES AZOOSPERMES

Soutenu publiquement  
Le, 09/11/2017

### Commission du jury

M. N'GUESSAN JEAN DAVID	Professeur Titulaire	UFHB	Président
M. DJAMAN ALLICO JOSEPH	Professeur Titulaire	UFHB	Directeur
Mme DOSSO MIREILLE	Professeur Titulaire	UFHB	Co-Directeur
M. DOUMBIA YACOUBA	Professeur Titulaire	UAO	Rapporteur
Mme OUATTARA-SORO SHCHERAZADE	Maître de conférences	UFHB	Examineur



# **DEDICACES**

A Feu N'Guessan Brou Blaise  
Juste dire merci à Dieu  
de cette faveur qu'il m'a faite  
de t'avoir eu pour père, ami et confident.

# **REMERCIEMENTS**

Le présent mémoire de Thèse de Doctorat est le fruit des efforts conjugués de plusieurs bonnes volontés. Aussi, qu'elles trouvent ici ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier particulièrement :

**Le Programme d'Appui Stratégique à la Recherche Scientifique (PASRES)**, merci pour l'appui financier que vous m'avez accordé pour la réalisation de ce travail.

**Monsieur DJAMAN Allico Joseph**, Professeur titulaire de Biochimie / Parasitologie, cher Maître, travailler à vos côtés a été un honneur pour moi. Vous m'avez inculqué dans l'humilité et dans la stricte rigueur scientifique les bases fondamentales de la recherche. Je vous en remercie.

**Madame DOSSO Mireille**, Professeur titulaire de Microbiologie, Directeur de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, vous m'avez accordé votre permission et votre confiance pour la réalisation de ce travail dans votre structure. Cela m'a permis de bénéficier non seulement de votre encadrement et de celui de vos collaborateurs, mais aussi d'un plateau technique hautement performant dans un cadre adéquat pour la réalisation de mes travaux de recherche. Merci Professeur.

**Aux membres du Jury**, nos vifs remerciements vous reviennent pour l'intérêt que vous avez porté à notre étude, en acceptant de l'examiner et de l'enrichir de vos propositions.

A Monsieur N'GUESSAN Jean David, Professeur Titulaire à l'UFR Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny

A Monsieur DJAMAN Allico Joseph, Professeur Titulaire à l'UFR Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny

A Madame DOSSO Mireille, Professeur Titulaire à l'UFR Sciences Médicales, Université Félix Houphouët Boigny

A Monsieur DOUMBIA Yacouba, Professeur Titulaire à l'UFR Sciences Médicales, Université Alassane Ouattara

A Madame OUATTARA SORO Shcherazade, Maître de conférences à l'UFR Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny

A l'ensemble du corps enseignant de l'UFR Biosciences, je vous adresse mes remerciements.

Aux Messieurs COULIBALY Adama, N'GUESSAN Jean David et YAPI Houphouët Felix, (Professeurs Titulaires), Messieurs BAHY Calixte, BIDIE Alain dit Philippe, KRA Adou Koffi

Mathieu, OUATTARA Karamoko, TREBISSOU Johnson Jean Noël, YAPO Adou Francis, et YEO Dodéhé, (Maîtres de Conférences), Madame et Messieurs AHUA Maximin, BAGRE Issa, BLA Kouakou Brice, DJYH Bernard Nazaire, KOUASSI Kouakou Serge, OUATTARA Sitapha et THES Péhé Marie Epse SOUMAHORO (Maîtres - Assistants), Madame et Messieurs AKAKPO Akué Joël, ASSOHO Constance Epse LUTY, KIPRE Gueyraud Rolland (Chargés de Recherche), Madame et Messieurs AGRE Don Josette Epse KOUADIO, KOUASSI Konan et PAKORA Gilles Alex (Assistants) au laboratoire de Pharmacodynamie - biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët – Boigny.

**Professeur, Hauhouot-Attoungbre Marie Laure** nous tenons à vous témoigner notre gratitude, pour nous avoir enseigné les bases de la Biologie de la Reproduction. Merci

**Monsieur Coulibaly Founzégué Amadou**, Maître de Conférences, nous vous remercions d'avoir accepté de superviser ce travail. Nous vous remercions pour votre patience et pour la compréhension que vous avez eue à notre égard. Merci

**Professeur N'GUESSAN Raymond, Professeur YAPI Houphouët Félix, Professeur EDJEME-AKE Angèle, aux Docteurs YAYE Guillaume, BOYVIN Lydie, MEITE Souleymane, M'BOH Gervais** ; vous m'avez accordé à tout instant votre disponibilité, votre soutien scientifique et moral, merci.

**Aux collègues étudiants et les techniciens du département de Biochimie Clinique et Fondamentale de l'IPCI**, trouvez en ces mots, l'expression de ma reconnaissance pour le soutien dont j'ai bénéficié dans la réalisation de ce travail.

**Aux habitants des Perles I rue 4**, juste vous dire merci vous m'avez soutenus et accompagnés dans cette aventure. Merci.

**Aux familles N'GUESSAN, AMAN, YAPO, TRAORE, TOURE, TIAO, OUEDRAOGO, TRAORE Ahmed, N'DIAYE, BARRY**, merci pour tout le soutien que vous m'avez apporté.

**A la famille N'GUESSAN**, merci pour votre amour, votre disponibilité, et vos encouragements.

**A Monsieur Vincent AMON**, juste te dire merci pour ce chemin de vie que tu prends avec moi. Merci.

# **AVANT-PROPOS**



La reproduction est l'une des activités fondamentales partagées par toutes les espèces vivantes. Dans l'espèce humaine, la reproduction est sexuée. Plusieurs paramètres sont indispensables à son bon déroulement. Il s'agit de la qualité et de la fréquence des rapports sexuels, l'intégrité des voies génitales de la femme et de l'homme, la qualité des gamètes, l'état psychologique, l'hygiène de vie, la bonne santé générale, l'alimentation et la prise de certains médicaments. Ces différents paramètres permettent d'établir la fertilité du couple qui dépend de la fécondité de ses deux membres.

Certains couples rencontrent des difficultés à procréer. La prise en charge du couple infertile nécessite une coordination étroite entre les cliniciens gynécologues et les biologistes. En effet, l'exploration de l'infertilité du couple fait appel à toutes les disciplines de la biologie : l'hormonologie, la bactériologie, la virologie, l'hématologie, la génétique et la biologie de la reproduction.

La Biologie de la Reproduction a pour but la mise en place de techniques de biologie interventionnelle au cours de l'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) et le diagnostic des pathologies de la procréation. Elle fait intervenir la recherche scientifique qui a pour but d'améliorer et de mettre en place des techniques d'AMP, de diagnostic et de prise en charge de l'infertilité. Elle permet aussi d'acquérir des connaissances sur les mécanismes physiologiques de la reproduction.

Dans cette optique, le présent travail a été réalisé au sein de l'Unité de Biologie de la Reproduction du Département de Biochimie Clinique et Fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire sous la direction du Professeur Djaman Allico Joseph et la supervision technique du Professeur Coulibaly Founzégué. L'Unité de Biologie de la Reproduction affiche son dynamisme en s'intéressant à plusieurs axes de la recherche scientifique qui sont :

- l'identification de nouveaux biomarqueurs du plasma séminal
- l'étude du génome du spermatozoïde
- l'identification de potentiels marqueurs métaboliques du secretum des embryons au cours de leur développement *in vitro*.

## TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	I
REMERCIEMENTS.....	III
AVANT-PROPOS.....	VI
TABLE DES MATIERES.....	VIII
Liste des abreviations.....	IX
Liste des figures.....	XIII
Liste des figures en annexe.....	XV
Liste des tableaux.....	XVI
Liste des tableaux en annexe.....	XVI
INTRODUCTION.....	1
GENERALITES.....	4
I. APPAREIL GENITAL MASCULIN .....	5
I.1. Testicules.....	7
I.2. Canaux vecteurs des spermatozoïdes .....	9
I.2.1. Voies spermatiques intra-testiculaires.....	9
I.2.2. Voies spermatiques extra-testiculaires.....	9
I.3. Glandes annexes.....	10
I.3.1. Vésicules séminales.....	11
I.3.2. Prostate.....	11
I.3.3. Glandes de Cowper.....	11
I.4. Pénis.....	12
II. SPERMATOGENESE.....	12
II.1. Aspect cellulaire.....	14
II.1.1. Cellules germinales dans le testicule fœtal.....	14
II.1.2. Cellules germinales dans le testicule adulte.....	14
II.2. Aspect moléculaire.....	15
II.2.1. Hormones .....	15
II.2.1.1. Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) .....	16
II.2.1.2. Hormone folliculo-stimulante (FSH) .....	16
II.2.1.3. Hormone lutéinisante (LH) .....	16
II.2.1.4. Testostérone.....	17
II.2.2. Facteurs locaux.....	17
II.2.3. Contrôle neuro-endocrinien des fonctions gonadiques mâles.....	17

III. SPERMIOGENESE.....	18
IV. SPERME.....	19
IV.1. Spermatozoïde .....	19
IV.1.1. Tête.....	19
IV.1.2. Pièce intermédiaire .....	20
IV.1.3. Flagelle.....	20
IV.2. Plasma séminal.....	22
V. INFERTILITE MASCULINE .....	22
VI. AZOOSPERMIE.....	23
VI.1. Dosages hormonaux.....	23
VI.1.1. Dosage de la FSH .....	24
VI.1.2. Dosage de l'Inhibine B et de l' hormone Anti-müllerian hormone (AMH).....	24
VI.1.3. Dosage de la testostérone .....	24
VI.1.4. Dosage de la prolactine .....	25
VI.2. Biochimie séminale.....	25
VII. ELEMENTS MINERAUX ET LA FERTILITE MASCULINE.....	25
VII.1. Sodium.....	26
VII.2. Potassium.....	26
VII.3. Chlorure.....	27
VII.4. Calcium.....	27
VII.5. Magnésium.....	27
VII.6. Phosphore.....	28
VII.7. Fer.....	28
VIII. STRESS OXYDATIF.....	28
VIII.1. Antioxydants.....	30
VIII.2. Stress oxydatif et qualité du sperme.....	31
IX. VITAMINES.....	32
IX.1. Vitamine A.....	33
IX.2. Vitamine E.....	33
IX.3. Vitamine D.....	34
IX.4. Action des vitamines sur la fertilité.....	36
MATERIEL ET METHODES.....	38
I. MATERIEL.....	39
I.1. Site de l'étude.....	39
I.2. Matériel biologique .....	39

I.2.1. Critères d'inclusion.....	39
I.2.2. Critères de non inclusion.....	39
I.2.3. Critères d'exclusion pour l'étude des biomarqueurs.....	39
I.3. Matériel technique et réactifs.....	39
I.3.1. Matériel et réactifs pour la réalisation du spermogramme.....	39
I.3.2. Matériel et réactifs pour le dosage des éléments minéraux .....	43
I.3.3. Matériel technique et réactifs pour la détermination de la peroxydation lipidique et l'activité antioxydante totale.....	46
I.3.4. Matériel technique et réactifs pour le dosage des vitamines.....	48
II. METHODES.....	50
II.1. Réalisation du spermogramme.....	50
II.2. Conservation du plasma séminal.....	50
II.3. Dosage des éléments minéraux.....	51
II.3.1. Méthodes générales de dosage.....	51
II.3.2. Méthodes de dosage spécifique.....	51
II.4. Détermination de la peroxydation lipidique par le dosage des TBARS .....	53
II.5. Détermination de l'activité antioxydante totale (TAC).....	53
II.6. Méthodes de dosage des vitamines A, E, D.....	53
II.6.1. Préparation des solutions mères des standards .....	54
II.6.2. Calibration .....	54
II.6.3. Extraction des vitamines A, D, E .....	54
II.6.4. Critères chromatographiques.....	54
II.6.5. Détermination de la concentration des vitamines A D E dans le plasma séminal.....	55
II.7. Analyse statistique.....	55
RESULTATS ET DISCUSSION.....	56
I. PROFIL SPERMIOLOGIQUE DES HOMMES REÇUS A L'IPCI.....	57
II. EVALUATION DES BIOMARQUEURS DU PLASMA SEMINAL.....	65
II.1. Evaluation des éléments minéraux dans le plasma séminal.....	67
II.2. Evaluation du stress oxydatif du plasma séminal .....	79
II.3. Evaluation des vitamines liposolubles dans le plasma séminal.....	84
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	96
ANNEXES.....	111

## LISTE DES ABREVIATIONS

ABp	:	Androgen Binding protein
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
AMH	:	Anti-müllerian hormone
AMP	:	Assistance Médicale à la Procréation
AMPc	:	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	:	Adénosine-5'-triphosphate
$\beta$ FGF	:	Basic Fibroblast Growth Factor
$\beta$ NGF	:	Beta Nerve growth factor
CNER-CI	:	Commission Nationale d'Ethique et de la Recherche de la Côte d'Ivoire
CpE	:	Corona Penetrating Enzyme
CPG	:	Cellules germinales primordiales
EGF	:	Epidermal growth factor
ERO	:	Espèces réactives de l'oxygène
FRAP	:	ferric reducing antioxydant power
FSH	:	Follicule Stimulating Hormon
GnRH	:	Gonadotrophine Releasing Hormon
GPx	:	glutathion peroxydase
GSH	:	Glutathion
HPLC	:	High Performance Liquid Chromatography
IGF1	:	Insulin Growth factor 1
IGFII	:	Insulin-like growth factor 2
IL1	:	Interleukine-1
IL6	:	Interleukine-6
IPCI	:	Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
IRM	:	Imagerie par Résonance Magnétique
IST	:	Infections sexuellement transmissibles
LH	:	Hormone Luteinisante
LIF	:	Leukemia inhibitory factor
MDA	:	Malonyldialdéhyde
NADPH	:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NGF	:	Nerve growth factor

NO synthase	:	Oxyde nitrique synthétase
OMS	:	Organisation mondiale de la santé
PFR	:	Protéine de fixation du rétinol
pH	:	Potentiel d'hydrogène
SCF	:	F-box containing complex
SGF	:	Seminiferous Growth Factor
SOD	:	superoxydes dismutases
TAC	:	Total Antioxidant Capacity
TBARS	:	Thio Barbituric Acid reactivities Substances
TGF <sub>α</sub>	:	Transforming growth factor alpha
TGF <sub>β</sub>	:	Transforming growth factor beta
TMP	:	1,1,3,3_tétraméthoxypropane
TNF <sub>α</sub>	:	Tumor necrosis factor alpha
TPTZ	:	2,4,6-tri (2-pyridyl)-s-triazine
UBR	:	Unité de Biologie de Reproduction

## LISTE DES FIGURES

	<b>Pages</b>
<b>Figure 1</b> : Organes génitaux masculins.....	6
<b>Figure 2</b> : Structure du testicule.....	8
<b>Figure 3</b> : Spermatogenèse .....	13
<b>Figure 4</b> : Spermatozoïde.....	21
<b>Figure 5</b> : Matériel pour la réalisation du spermogramme.....	41
<b>Figure 6</b> : Automate de spermiologie SQA-Vision®.....	42
<b>Figure 7</b> : Automate de biochimie Cobas C311® .....	43
<b>Figure 8</b> : Roche Diagnostics AVL 9180 Series® Electrolyte Analyzers .....	45
<b>Figure 9</b> : Spectrophotomètre T80 UV VIS ® .....	47
<b>Figure 10</b> : Chaîne de chromatographie en phase liquide de marque WATERS®.....	49
<b>Figure 11</b> : Répartition des différentes anomalies du spermogramme.....	58
<b>Figure 12</b> : Répartition des anomalies associées du spermogramme .....	59
<b>Figure 13</b> : Répartition de l'hyperviscosité associée ou non à l'asthénozoospermie.....	60
<b>Figure 14</b> : Représentation de la relation entre le volume et le pH du sperme .....	61
<b>Figure 15</b> : Concentration en sodium des normospermes et des azoospermes.....	69
<b>Figure 16</b> : Concentration en potassium des normospermes et des azoospermes.....	70

<b>Figure 17</b>	:	Concentration en chlorure des normospermes et de azospermes.....	71
<b>Figure 18</b>	:	Concentration en ion calcium des normospermes et des azospermes.....	72
<b>Figure 19</b>	:	Concentration en phosphate inorganique des normospermes et des azospermes.....	73
<b>Figure 20</b>	:	Concentration en magnésium des normospermes et azospermes.....	74
<b>Figure 21</b>	:	Concentration en fer des normospermes et des azospermes.....	75
<b>Figure 22</b>	:	Concentration moyenne en malonyldialdehyde du plasma séminal des normospermes et des azospermes.....	80
<b>Figure 23</b>	:	Activité Antioxydante Totale (TAC) du plasma séminal des normospermes et des azospermes.....	81
<b>Figure 24</b>	:	Profil chromatographique et du temps de rétention des vitamines A, D, E à la détection de 280nm.....	85
<b>Figure 25</b>	:	Concentration moyenne de la vitamine A du plasma séminal des normospermes et des azospermes .....	86
<b>Figure 26</b>	:	Concentration moyenne de la vitamine D du plasma séminal des normospermes et des azospermes.....	87
<b>Figure 27</b>	:	Concentration moyenne en vitamine E du plasma séminal des normospermes et des azospermes .....	88



## LISTE DES FIGURES EN ANNEXE

- Figure i** : Droite d'étalonnage du Malonyldialdéhyde.
- Figure ii** : Droite d'étalonnage du sulfate de fer pour la mesure de l'activité antioxydante totale.
- Figure iii** : Droite d'étalonnage du rétinol.
- Figure iv** : Droite d'étalonnage du cholécalciférol.
- Figure v** : Droite d'étalonnage de l'alpha tocophérol.

## LISTE DES TABLEAUX

### Pages

<b>Tableau I</b>	:	Caractéristiques du spermogramme des normozoospermes et des azoospermes .....	63
<b>Tableau II</b>	:	Données statistiques de la concentration en vitamine A.....	81
<b>Tableau III</b>	:	Données statistiques de la concentration en vitamine D.....	82
<b>Tableau IV</b>	:	Données statistiques de la concentration en vitamine E.....	83

## LISTE DES TABLEAUX EN ANNEXE

<b>Tableau i</b>	:	Normes de l’OMS 2010	
<b>Tableau ii</b>	:	Marqueurs du plasma séminal témoignant de l’activité des glandes annexes	
<b>Tableau iii</b>	:	Bilan d’une azoospermie obstructive	
<b>Tableau iv</b>	:	Formule chimique des vitamines A D E	

# **INTRODUCTION**

La pérennité de l'espèce humaine prend ses fondements dans la procréation qui subit depuis quelques années des bouleversements liés à l'infertilité. L'infertilité se définit comme étant l'incapacité pour un couple de parvenir à une grossesse clinique après un an de rapports sexuels réguliers et non protégés (**Zegers-Hochschild et al., 2009**). Dans le monde, l'infertilité touche 15 % des couples (**Leridon, 1982**). Les facteurs masculins sont les seuls responsables dans 20 % des cas. Ceci entraîne une contribution masculine à l'infertilité du couple qui va de 30 à 40 % (**Thonneau et al., 1991**). En Afrique, notamment en Côte d'Ivoire, environ 15,6 % des patients venus en consultation pour un désir de paternité présentent une infertilité (**Ouegnin et al., 2008**). Les anomalies du sperme sont nombreuses et les troubles de la production des spermatozoïdes sont en partie responsables (**Thonneau et al., 1991**).

L'azoospermie correspond à l'absence totale de spermatozoïdes dans le sperme. Elle est l'une des causes de l'infertilité masculine. Elle se présente sous deux formes : excrétoire par obstacle sur les voies génitales ou sécrétoire par défaut de production testiculaire des spermatozoïdes (**Robin et al., 2010**). Son diagnostic associe à l'examen clinique, des examens complémentaires de biologie et d'imagerie (**Coat et al., 2011**).

Le spermogramme est l'examen de référence permettant de constater l'absence ou la présence de spermatozoïdes dans l'éjaculat (**OMS, 2010**). La biochimie séminale est aussi impliquée dans le bilan biologique d'exploration de l'azoospermie (**Rollet, 1999**). Elle est prescrite en seconde intention à chaque fois qu'est suspectée une anomalie des glandes et des voies génitales (absence de canaux déférents à l'examen clinique, dilatation épидидymaire, hypospermie, pH séminal pathologique, vésicules séminales dystrophiques...) (**Robin et al., 2010**). Cet examen consiste à doser dans le plasma séminal un ou plusieurs marqueurs spécifiques des glandes ou des voies génitales masculines : le fructose pour les vésicules séminales, la L-carnithine ou l' $\alpha$ -glucosidase pour l'épididyme, le zinc, l'acide citrique et/ou les phosphatases acides pour la prostate. L'abaissement de l'un ou de plusieurs de ces marqueurs signe une atteinte ou une obstruction de sévérité variable des glandes et des voies séminales extra testiculaires et aide ainsi à en localiser le niveau. Le plasma séminal est un indicateur important de la qualité et du suivi de l'infertilité masculine (**Umeyama et al. 1986 ; Coulibaly et al., 2014a**). En effet, celui-ci contient des marqueurs biochimiques qui sont utilisés dans la réalisation de la biochimie séminale. Il s'agit du citrate, du zinc, du fructose, de l' $\alpha$ -glucosidase et de la L-carnitine. Ceux-ci permettent, selon leur concentration dans le plasma séminal, d'étudier le fonctionnement des glandes annexes (**Sendi et al., 1994**). Pourtant, le plasma séminal contient d'autres composés qui rendent compte du fonctionnement de l'appareil génital masculin (**Coulibaly et al., 2014a**). Ceux-ci pourraient être exploités dans le diagnostic de l'azoospermie. Aussi, ces marqueurs biochimiques utilisés pour le diagnostic de l'azoospermie sont par ailleurs très onéreux pour les laboratoires en Afrique noire et

donc peu accessible à une grande partie de la population. Aussi, face aux potentialités qu'offrent le plasma séminal, de nombreux chercheurs orientent leurs travaux vers l'identification de nouveaux biomarqueurs pouvant intervenir dans le diagnostic de l'infertilité masculine (**Coulibaly *et al.*, 2014a ; 2014b**). Afin de répondre aux exigences en matière de recherche sur l'azoospermie ; les autres composés du plasma séminal devraient faire l'objet d'une étude en vue de l'identification de nouveaux marqueurs spécifiques. Ainsi, les éléments minéraux, les marqueurs du stress oxydatif, les vitamines A, D et E, par leur action sur le fonctionnement de l'appareil génital masculin, pourraient servir de marqueurs biochimiques dans le diagnostic de l'azoospermie.

En effet, très peu d'informations sont disponibles sur le rôle de ces éléments dans l'azoospermie. Face à cette problématique de la disponibilité des paramètres biologiques standards du plasma séminal, l'étude de ceux-ci peut apporter des informations complémentaires dans le diagnostic de l'azoospermie.

Ainsi, la présente étude a pour objectif général d'identifier de potentiels marqueurs biochimiques de différenciation du plasma séminal des azoospermes et des normozoospermes.

Les objectifs spécifiques qui en découlent sont les suivants :

1. Déterminer les différentes concentrations des paramètres biologiques sélectionnés du plasma séminal des spermatozoaires normozoospermiques et azoospermiques après la réalisation du spermogramme.
2. Etablir la corrélation entre les différentes concentrations déterminées des azoospermes et des normozoospermes.
3. Identifier de nouveaux marqueurs biochimiques du diagnostic de l'azoospermie.

Ainsi, le présent manuscrit est organisé en sept parties à savoir :

- Les généralités bibliographiques qui définissent le fonctionnement de l'appareil génital mâle, et précisent l'action des sels minéraux, du stress oxydatif, et des vitamines sur le maintien de la fertilité.
- La seconde partie présente le matériel et les méthodes utilisées.
- Les résultats obtenus sont présentés dans la troisième partie.
- La quatrième partie est consacrée à la discussion.
- La cinquième et la sixième partie sont dédiées respectivement à la conclusion et aux références bibliographiques.
- Enfin la septième partie présente les annexes.

# **GENERALITES**

## I. APPAREIL GENITAL MASCULIN

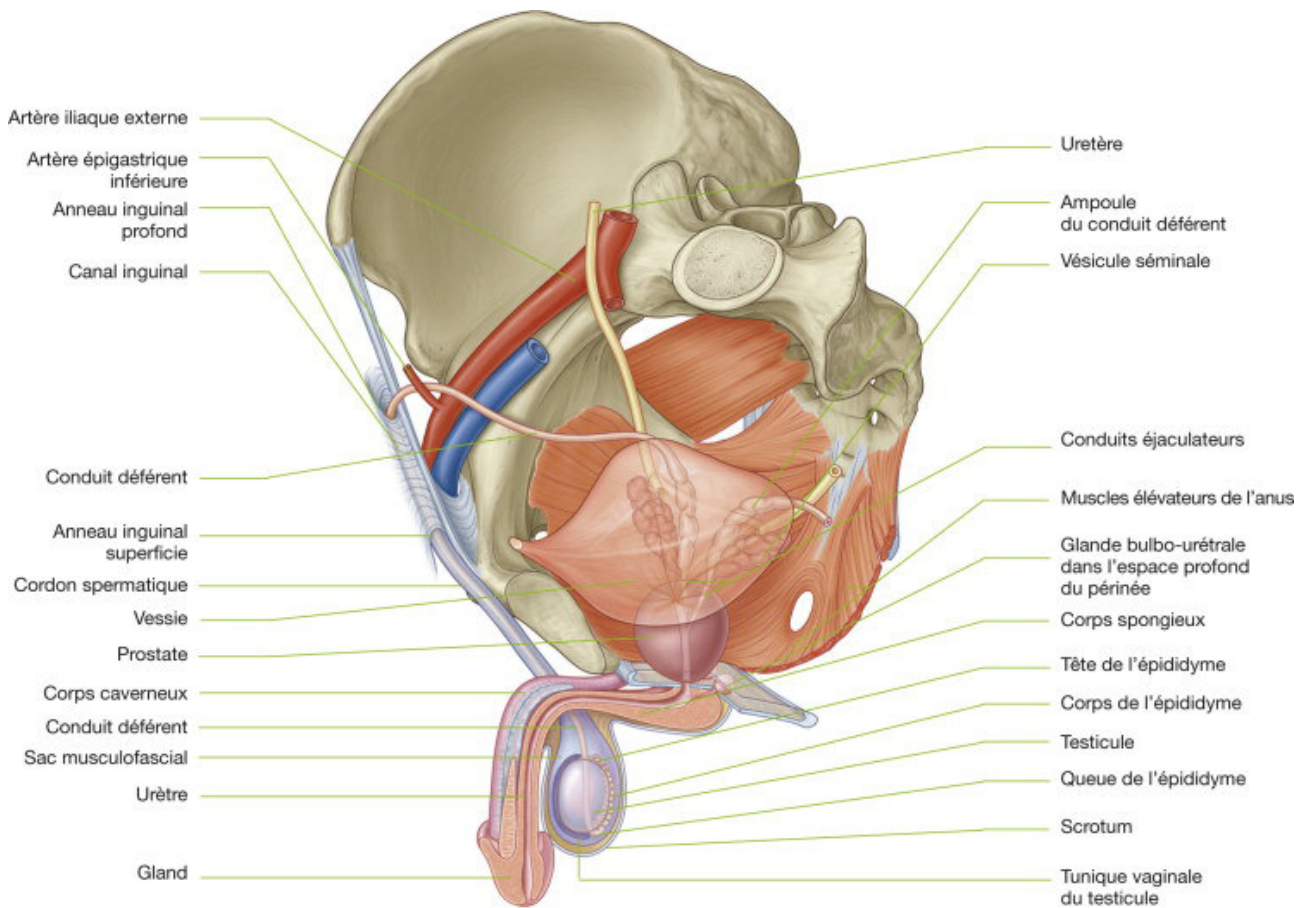
Au plan anatomique, l'appareil génital mâle présente deux parties :

- les organes génitaux externes : les bourses, les testicules, l'épididyme et la verge
- les organes génitaux internes : la prostate, les voies excrétrices spermatiques, les vésicules séminales.

Les bourses contiennent les deux testicules, leurs enveloppes et le début des voies excrétrices spermatiques (les épидидymes, et les canaux déférents). Chaque testicule est relié à un épидидyme qui aboutit à un canal déférent. Les deux canaux déférents pénètrent par l'anneau inguinal dans le petit bassin mais restent sous-péritonéaux. Ils longent les parois latérales de la vessie et convergent en arrière vers la ligne médiane. Ils présentent une dilatation, l'ampoule déférentielle, avant de recevoir les vésicules séminales. Ils se poursuivent par les canaux éjaculateurs qui se jettent séparément dans l'urètre à sa face postérieure, au niveau du veru-montanum. Il devient génito-urinaire en aval, vecteur de sperme lors de l'éjaculation. Autour de l'urètre se place la glande prostatique. Après un court trajet prostatique, l'urètre se coude et rejoint les organes érectiles qui sont : les deux corps caverneux et le corps spongieux. L'ensemble urètre et les organes érectiles est contenu dans le pénis (**Figure 1**).

Sur le plan fonctionnel, l'appareil génital masculin, présente quatre parties (**Coujard & Poirier 1980**) :

- les testicules,
- les canaux vecteurs de spermatozoïdes,
- les glandes annexes,
- le pénis.



crânial  
 Ventral

**Figure 1 : Organes génitaux masculins (Dillenseger, 2011).**



## I.1. Testicules

Les testicules correspondent à une paire d'organes ovales légèrement aplatis qui mesurent environ 4 cm de longueur et 2,5 cm de diamètre (**Figure 2**). Ils sont contenus dans un sac extra-abdominal ou scrotum. Chaque testicule est recouvert de couches de tissus fibreux et résistants appelées les tuniques. La couche externe est appelée la tunique vaginale tandis que celle interne correspond à l'albuginée.

La tunique vaginale correspond à la membrane séreuse qui enveloppe les testicules. Elle est issue du péritoine pendant le développement embryonnaire. Elle possède un feuillet viscéral, accolé au testicule, et un feuillet pariétal, fixé à la paroi du scrotum. Elle délimite un espace de glissement autour du testicule facilitant sa mobilité.

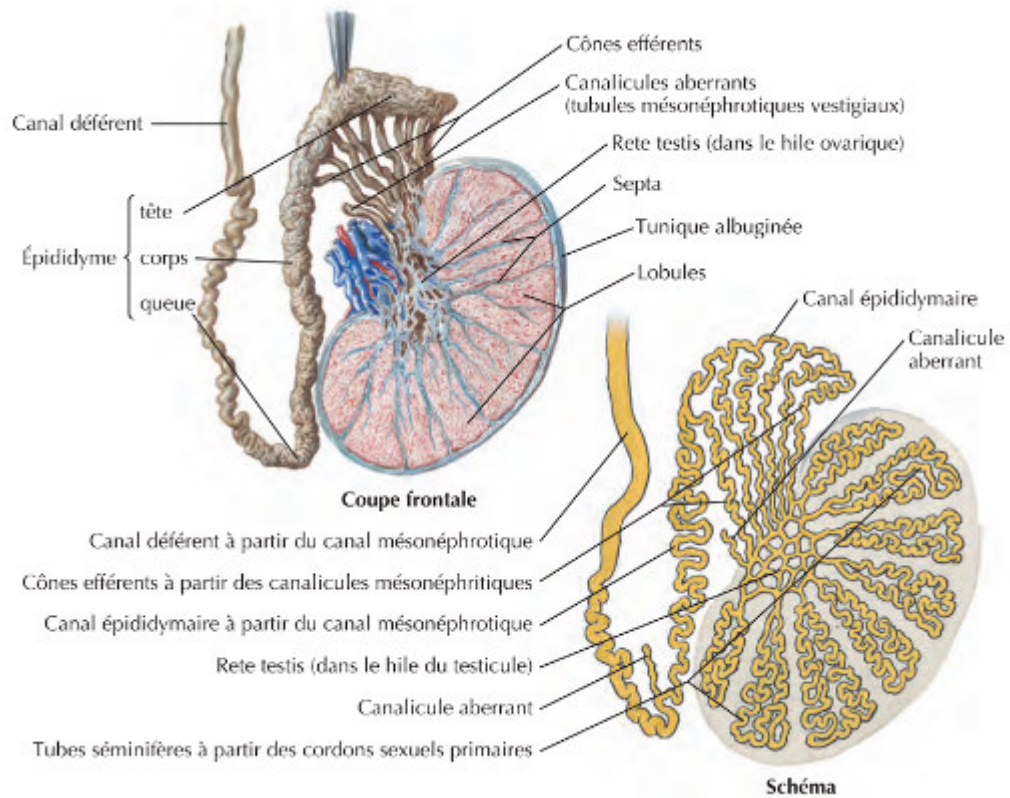
L'albuginée correspond à la membrane fibreuse inextensible de couleur blanc bleuté entourant le testicule. Des cloisons se détachent de l'albuginée pour délimiter à l'intérieur du testicule des lobules contenant les tubules séminifères. Inextensible, l'albuginée maintient une tension permanente sur la pulpe testiculaire favorisant la migration des spermatozoïdes vers l'épididyme.

Il existe environ 800 tubes séminifères enroulés, serrés dans un testicule. Les tubes séminifères s'ouvrent sur une série de canaux non enroulés et reliés les uns aux autres : le *rete testis*. Des canaux relient le *rete testis* à un tube étroitement enroulé appelé l'épididyme qui se joint au canal déférent. Les tubes séminifères sont tapissés d'une couche de cellules nourricières : les cellules de Sertoli. Entre les tubes séminifères se trouvent les cellules de Leydig, qui produisent différentes hormones stéroïdes. Chaque testicule est maintenu dans le scrotum par un cordon spermatique, qui est fait de tissu conjonctif résistant et de muscles. Chaque cordon spermatique contient un canal déférent, des nerfs, des vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Les testicules possèdent deux fonctions :

- une fonction exocrine qui correspond à la spermatogenèse. Elle est la condition préalable à toute reproduction, et peut être assurée par un seul testicule.
- une fonction endocrine qui est la stéroïdogenèse (**Smith et Walker, 2014**). Elle est active in utero lors de la différenciation sexuelle, brièvement dans les premiers mois suivant la naissance, puis à partir de la puberté jusqu'à la fin de la vie. Elle correspond à la sécrétion hormonale d'androgènes dont le principal est la testostérone. La testostérone induit non seulement la spermatogenèse, mais elle est aussi responsable des importantes modifications pubertaires et du développement des caractères sexuels secondaires masculins (pilosité, mue de la voix, répartition musculaire).

Les testicules sont sous le contrôle permanent d'un système de régulation neuroendocrinien : l'hypophyse et l'hypothalamus. Ces glandes obéissent elles mêmes à un rétrocontrôle hormonal (**Zirkin, 1998**).



**Figure 2 : Structure du testicule (Cochard, 2015).**

## **I.2. Canaux vecteurs des spermatozoïdes**

Les voies spermatiques ou voies génitales masculines sont de deux types :

- les voies spermatiques intra-testiculaires,
- les voies spermatiques extra-testiculaires.

### **I.2.1. Voies spermatiques intra-testiculaires**

Les tubes séminifères débouchent sur des segments courts à lumière étroite de 25 microns de diamètre. Il s'agit des tubes droits. Ceux-ci sont tapissés d'un épithélium cubique. Ces derniers s'ouvrent au niveau du corps d'Highmore dans un réseau labyrinthe de canaux à épithélium pavimenteux, le rete testis. Les spermatozoïdes, immatures et immobiles, traversent les voies spermatiques intratesticulaires poussés par la pression du plasma séminal primitif sécrété de façon continue par les cellules de Sertoli.

### **I.2.2. Voies spermatiques extra-testiculaires**

Elles débutent par les cônes efférents, se poursuivent par le canal épидидymaire, le canal déférent et s'achèvent par le canal éjaculateur.

#### **• Cônes efférents**

Ils sont au nombre de 10 à 12 canaux, de 20 cm de long sur 0,2 mm de diamètre, assurant le transport des spermatozoïdes du rete testis à la tête de l'épididyme. Ils présentent trois types de cellules :

- des cellules ciliées, munies de véritables cils vibratiles, aident à la progression des spermatozoïdes déjà poussés par la pression du plasma séminal.
- des cellules glandulaires.
- des petites cellules basales de remplacement situées contre la membrane basale.

L'épithélium est cerné par un manchon de quelques fibres musculaires lisses contenues dans un tissu conjonctif lâche très vascularisé. Les contractions péristaltiques de la tunique musculaire lisse participent aussi au transit des spermatozoïdes.

#### **• L'épididyme**

L'épididyme borde la face supérieure et postérieure de chaque testicule. Il correspond à un tube rétracté, appelé le canal épидидymaire, mesurant en moyenne six mètres de long. Il comprend trois parties :

- la tête de l'épididyme qui prend naissance sur la partie supérieure du testicule ;

- le corps de l'épididyme qui est la partie intermédiaire se prolongeant sur la face dorsale du testicule ;

- la queue de l'épididyme qui constitue la dernière partie se prolongeant par le canal déférent.

Les spermatozoïdes peuvent être stockés dans l'épididyme et y survivre jusqu'à environ trois semaines. Les gamètes sont modifiés tout au long de leur trajet dans l'épididyme. En effet, sous l'action des androgènes (en particulier de la testostérone) sécrétés par les cellules de Leydig, les spermatozoïdes y acquièrent leur mobilité et sont décapacités. Ils y obtiennent aussi leur aptitude à se fixer sur la zone pellucide de l'ovocyte.

- **Le canal déférent**

Le canal déférent fait suite au canal épидидymaire et assure le transit des spermatozoïdes jusqu'à l'urètre, *via* le canal éjaculateur; c'est un tube droit, long de 50 cm environ, contenu dans le cordon spermatique ; sa paroi est épaisse et comporte trois tuniques :

- la muqueuse mince, formée d'un épithélium pseudostratifié.
- la musculuse, épaisse formée de trois couches de fibres musculaires lisses
- l'adventice est faite de tissu conjonctif lâche vascularisé et innervé.

Le canal déférent joue un rôle primordial au moment de l'éjaculation. En effet, les plis de la muqueuse se distendent et permettent ainsi le passage, dans la lumière du canal des nombreux spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme. La musculuse émet des ondes péristaltiques puissantes et brèves assurant l'expulsion rapide des spermatozoïdes. Ces phénomènes sont sous le contrôle nerveux de fibres orthosympathiques adrénérergiques abondantes à la fin de l'épididyme et le long du canal déférent.

- **Canal éjaculateur**

Le canal éjaculateur naît de la jonction du canal déférent et de l'abouchement de la vésicule séminale. Il pénètre dans la prostate et s'y termine dans l'urètre, au niveau du colliculus séminal. Sa direction est oblique caudalement et ventralement. Il mesure à peu près 2 cm de longueur.

Au cours de l'éjaculation, le sperme passe par ce conduit pour ensuite emprunter l'urètre, et finalement sortir de l'organisme par l'extrémité distale du pénis.

### **I.3. Glandes annexes**

Les glandes annexes sécrètent des fluides et des substances qui constituent le plasma séminal. Elles sont constituées :

- des vésicules séminales,
- de la prostate,

- des glandes de Cowper

### **I.3.1. Vésicules séminales**

Les vésicules séminales sont androgéno-dépendantes (**Aumüller et Riva, 1992**). La castration entraîne leur involution. Leurs sécrétions sont caractérisées par un pH alcalin dont le pH est de 8,5. Ces sécrétions contiennent :

- du fructose qui assure la nutrition des spermatozoïdes ;
- des prostaglandines qui aident à la fécondation en rendant le mucus de la femme plus réceptif à la mobilité des spermatozoïdes. Elles entraînent des contractions péristaltiques renversées dans l'utérus et les trompes de Fallope afin de permettre aux spermatozoïdes d'effectuer leur migration vers l'ampoule le plus rapidement ;
- des protéines qui correspondent à des facteurs de décapacitation qui se fixent sur les spermatozoïdes au moment de l'éjaculation ; à des facteurs de coagulation du sperme jouant un rôle de protection des spermatozoïdes dans le vagin ; à des facteurs immuno-suppresseurs.

Au cours de l'éjaculation, les sécrétions des vésicules séminales sont évacuées et mélangées à celle de la prostate.

### **I.3.2. Prostate**

La prostate est formée de petites glandes entourées d'un tissu de soutien musculaire conjonctif, vasculaire et nerveux. Les sécrétions prostatiques représentent 30 % du volume de l'éjaculat (**Rollet, 1999**). Elles correspondent à un liquide acide, dont le pH est de 6,4. Les sécrétions prostatiques sont androgéno-dépendantes et elles contiennent les enzymes de la coagulation et la fibrinolyse. Les enzymes de la coagulation transforment le fibrinogène des vésicules séminales en fibrine. Celle-ci fait coaguler le sperme ce qui empêche son élimination lors du retrait du pénis hors du vagin. Peu après, le caillot de sperme est lysé par la fibrinolyse de la prostate. Ceci permet la libération des spermatozoïdes dans le tractus génital féminin. Le mélange du plasma séminal avec les spermatozoïdes produits par les testicules se fait au niveau de la prostate. Le sperme passe ensuite dans l'urètre au moment de l'éjaculation.

### **I.3.3. Glandes de Cowper**

Elles sont encore appelées glandes bulbo-urétrales ou glandes de Mery-Cowper. Leur rôle est de produire la cyprine, qui est un mucus translucide et alcalin émis tout au long de l'excitation sexuelle ainsi qu'au moment de l'éjaculation. La cyprine prépare l'acte sexuel et elle doit être émise en quantité suffisante (**Pedron et al., 1997**). Elle permet la réalisation de plusieurs fonctions :

- la lubrification du gland et de l'urètre, pour permettre la pénétration au cours du rapport sexuel et faciliter l'écoulement du sperme ;
- la neutralisation du pH de l'urètre et du vagin afin d'éviter que les spermatozoïdes soient abimés par l'acidité du milieu ;
- une fonction bactéricide.

#### **I.4. Pénis**

Il correspond à l'organe de la copulation et de la miction chez l'homme. C'est un organe érectile qui contient un système vasculaire complexe. Ce système vasculaire est gouverné par de nombreux mécanismes hormonaux et par l'activité cérébrale. Le pénis est constitué de trois corps érectiles :

- les deux corps caverneux pairs et symétriques,
- le corps spongieux impair et médian.

Le bout distal du corps spongieux, élargi et côniforme, constitue le gland du pénis. Il est entouré par le prépuce. L'urètre est la dernière partie du tractus urinaire, il traverse le corps spongieux. Sa sortie, correspond au méat urétral, qui se trouve au bout du gland. L'urètre sert à la miction et à l'éjaculation. L'éjaculation est l'émission de sperme à travers l'urètre pendant l'érection, les mouvements éjaculatoires sont gouvernés par la prostate.

## **II. SPERMATOGENESE**

La spermatogenèse est le processus biologique par lequel les cellules germinales se transforment progressivement en spermatozoïdes (**Figure 3**). Elle présente deux aspects : un aspect cellulaire et un aspect moléculaire.

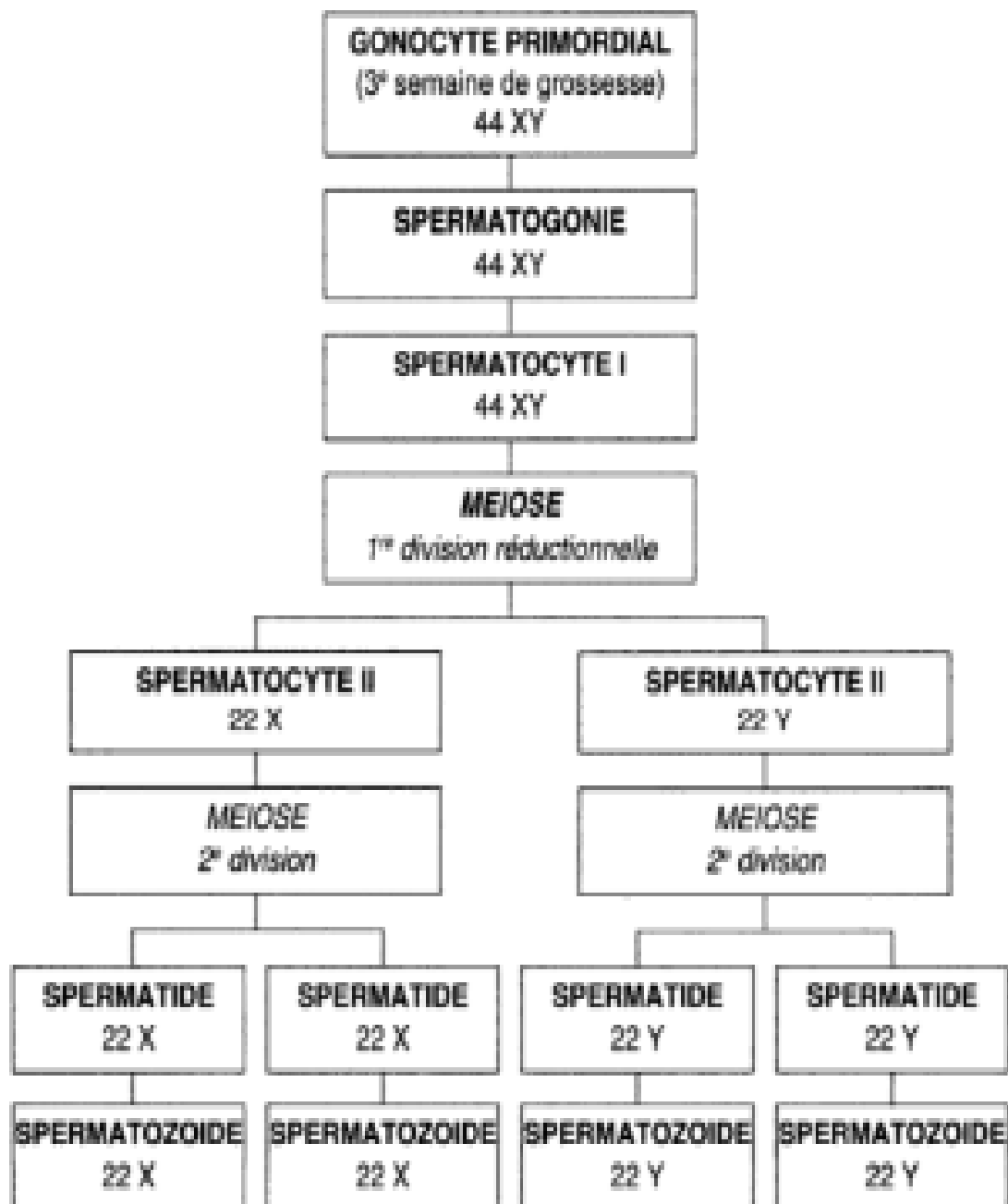


Figure 3 : Spermatogenèse ( Zorn et Savale, 2005).

## **II.1. Aspect cellulaire**

Il se déroule dans le testicule fœtal et adulte.

### **II.1.1. Cellules germinales dans le testicule fœtal**

Les cellules germinales initialement localisées dans le mésoderme extra-embryonnaire, migrent vers la gonade. Pendant leur migration, elles se multiplient. Chez l'homme cette migration se fait entre la 4<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> semaine de gestation. Lorsque la gonade est différenciée, les cellules germinales ou gonocytes, se multiplient puis entrent en repos mitotique jusqu'à la puberté (**Hamamah *et al.*, 1999**).

### **II.1.2. Cellules germinales dans le testicule adulte**

La puberté est caractérisée par la reprise de la spermatogenèse. Les cellules germinales prolifèrent et se différencient dans les tubes séminifères en rapport étroit avec les cellules de Sertoli. Ce processus implique les étapes suivantes : la multiplication, la maturation, la différenciation, et l'apoptose.

- **Phase de multiplication**

Dans la couche basale de l'épithélium germinale, il y a plusieurs types de spermatogonies. Les cellules souches de type A se divisent et forment leurs homonymes (division homonyme) permettant ainsi à la population des cellules souches de rester constante. Le début de la spermatogenèse commence par une division hétéronyme, suite à laquelle les deux cellules filles (deuxième groupe de cellules de types A) restent liées les unes aux autres par un mince pont cytoplasmique. C'est à partir de ce processus qu'une spermatogonie s'engage dans la spermatogenèse. Les spermatogonies de type B sont formées à la suite d'une division mitotique supplémentaire. Puis elles se divisent également par mitose pour donner les spermatocytes primaires (spermatocytes I).

- **Phase de maturation**

Elle correspond à la méiose. Les spermatocytes primaires subissent une première division méiotique. Ils entament immédiatement la phase S (phase préleptotène de la méiose). Ils dédoublent leur ADN puis ils quittent la zone basale et atteignent le milieu spécial de la zone adluminale en rompant transitoirement les complexes jonctionnels (tight junction) des cellules de Sertoli. Après la phase S, ces cellules entament les stades de la prophase méiotique et sont nettement visibles au microscope optique. La prophase dure 24 jours et comporte 5 stades :

- leptotène,



- zygotène,
- pachytène,
- diplotène
- diacinèse.

Au cours de la prophase chaque cellule germinale subit une recombinaison du matériel génétique hérité du père et de la mère. A cette longue prophase font suite rapidement une métaphase, une anaphase et une télophase. Chaque spermatocyte primaire donne deux spermatocytes secondaires (spermatocytes II).

Les spermatocytes II abordent directement la deuxième division méiotique qui donne naissance à deux spermatides haploïdes. Ceux-ci ne possèdent plus que la moitié du contenu en ADN. Comme il n'y a ni duplication de l'ADN, ni recombinaison du matériel héréditaire. La deuxième division méiotique progresse rapidement. Elle ne dure qu'environ 5 heures. Il est donc rare de trouver les spermatocytes secondaires sur les coupes histologiques (**Cheng et Mruk, 2013**).

- **Phase de différenciation**

Elle est aussi appelée la spermiogénèse. Elle ne comporte pas de division. Mais elle correspond à la différenciation des spermatides en spermatozoïdes qui seront libérés dans la lumière du tube séminifère.

- **Apoptose**

Elle intervient dans le processus d'élimination des cellules germinales présentant des anomalies chromosomiques. Elle permet l'ajustement du nombre de cellules germinales par rapport au nombre de cellules de Sertoli qui est constant.

## **II.2. Aspect moléculaire**

La spermatogénèse est régulée par un système neuro-endocrinien, désigné sous le nom d'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Cette régulation englobe une série de mécanismes de signalisation. Elle est orchestrée par un très grand nombre de gènes impliquant les signaux hormonaux, locaux (les facteurs de croissance, les cytokines) et les facteurs de transcriptions permettant l'expression de gènes cibles impliqués dans les différentes étapes de la multiplication, la maturation, la différenciation et de l'apoptose des cellules germinales.

### **II.2.1. Hormones**

Les fonctions du testicule sont sous le contrôle des gonadotrophines. Il s'agit de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et de l'hormone lutéinisante (LH). Elles sont sécrétées de manière

continue et régulière par l'hypophyse en réponse à l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) provenant de l'hypothalamus (**Dubest et Pugeat, 2005**).

### **III.2.1.1. Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH)**

En amont du complexe hypothalamo-hypophysaire, il existe des neurones à kisspeptine qui expriment des prolongements axonaux vers les neurones à hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) de l'hypothalamus. Ceux-ci expriment à leur surface le récepteur à kisspeptine (KISS1R). La libération de kisspeptine va entraîner *via* l'activation du récepteur KISS1R la dépolarisation du neurone à GnRH et la libération de GnRH dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Celle-ci s'effectue de façon pulsatile toutes les 90 minutes. La GnRH agit au niveau de l'hypophyse, laquelle va sécréter les gonadotrophines FSH et LH qui sont libérés dans la circulation sanguine (**Bertrand-Delepine et al., 2016**)

### **III.2.1.2. Hormone folliculo-stimulante (FSH)**

Elle est importante pour la spermatogénèse. Cependant des incertitudes existent encore quant aux conditions de son action (**Simoni et al., 1999**). Son rôle majeur pourrait s'exercer pendant la vie fœtale sur la prolifération des cellules de Sertoli et à l'âge adulte sur l'initiation de la spermatogénèse. L'absence de la FSH entraîne des testicules de petites tailles et la testostérone plasmatique est maintenue à des taux normaux au prix d'une LH élevée (**Simoni et al., 1999**). La FSH pourrait aussi participer à la stimulation indirecte de la production de la testostérone au niveau des cellules de Leydig et d'autres part réguler l'action de cette hormone au niveau des cellules cibles en contrôlant l'expression du gène des récepteurs des androgènes. Elle présente des récepteurs au niveau de la cellule de Sertoli et y induit la synthèse des éléments suivants :

- une protéine transporteuse de la testostérone, les protéines de liaison des androgènes (ABp),
- l'inhibine, qui existe sous 2 formes A et B,
- un facteur mitogène, le facteur de croissance séminifère (SGF)
- un facteur de croissance à l'insuline (IGF1)
- un des activateurs du plasminogène,
- une Hormone Anti Müllérienne (AMH) dans le testicule fœtal uniquement.

### **II.2.1.3. Hormone lutéinisante (LH)**

Elle contrôle la production des androgènes par un mécanisme de rétro inhibition (**Dayalu et Kittok, 1996**). Elle présente des récepteurs sur les cellules de Leydig et y induit la synthèse des molécules suivantes :

- les hormones stéroïdiennes : les androgènes, en particulier la testostérone,

- l'ocytocine et la vasopressine.

#### **II.2.1.4. Testostérone**

Elle contribue à la mise en place des premiers stades de la spermatogenèse avec la FSH, mais seule la testostérone intervient dans la spermiogenèse. La concentration testiculaire en testostérone est plus élevée que celle du plasma. En effet, un taux élevé de testostérone intratesticulaire est requis pour le maintien de la spermatogenèse. Enfin, même s'il est établi que la FSH et les androgènes sont essentiels à la production des spermatozoïdes, les gènes cibles dans les cellules de Sertoli qui interviennent dans la spermatogenèse n'ont pas encore été identifiés (**Simoni et al., 1999**).

#### **II.2.2. Facteurs locaux**

Les différentes étapes de la spermatogenèse sont sous le contrôle direct de certains facteurs de croissance et des cytokines produits par les cellules de Sertoli. Ces facteurs régulent le développement des cellules de la lignée germinale pendant la vie fœtale, la puberté et la vie adulte. Ainsi, les cellules germinales expriment des récepteurs spécifiques pour des molécules produites par les cellules de Sertoli comme EGF / TGF $\alpha$ , les TGF $\beta$  et ses peptides apparentés, le SCF, l'IGF I et le  $\beta$ FGF (**Benahmed et al., 2000**).

Pendant le développement embryonnaire de la gonade mâle, des facteurs locaux comme le SCF favorisent la migration des cellules germinales primordiales (CPG) ainsi que leur survie (rôle anti-apoptotique). La multiplication des gonocytes est stimulée par le SCF, le LIF et le  $\beta$ FGF. La prolifération des spermatogonies à la puberté ou lors de chaque cycle de la spermatogenèse à l'âge adulte, serait induite par le SCF, l'EGF / TGF $\alpha$  et l'IGF-I, tandis que le TGF $\beta$  et l'inhibine diminueraient la prolifération de ces cellules. Plusieurs molécules semblent être impliquées dans les phénomènes de la méiose (EGF, TGF $\beta$ ,  $\beta$ NGF) et de la spermiogenèse (EGF).

De plus, ces facteurs sertoliens qui contrôlent la spermatogenèse, peuvent être régulés par les hormones. Ces observations illustrent, de nouveau, le rôle de relais local des molécules de signalisation vis-à-vis des hormones (FSH, testostérone). Cependant, l'expression de ces facteurs sertoliens peut être aussi sous le contrôle de facteurs locaux comme le TNF $\alpha$ , l'IL1 $\alpha$  ou le NGF, provenant des cellules germinales (**Benahmed et al., 2000**).

#### **II.2.3. Contrôle neuro-endocrinien des fonctions gonadiques mâles**

La maturation des testicules à la puberté implique une initiation de la production d'androgènes par les cellules de Leydig, la croissance des tubules séminifères et le démarrage de la spermatogenèse (**Hamamah et al. 1999**). Ces trois événements sont sous le contrôle du système

neuro-endocrinien. La GnRH provoque la sécrétion hypophysaire de la FSH et de la LH. Pendant l'enfance, les concentrations plasmatiques de la FSH et de la LH restent basses.

A la puberté, la LH agit sur les cellules de Leydig pour stimuler la production de la testostérone. Une partie de la testostérone va agir sur les cellules de Sertoli pour initier la spermatogenèse. Selon les tissus, la testostérone libre joue le rôle de pro-hormone et sera métabolisée en di-hydrotestotérone (DHT) ou aromatisée en œstradiol pour agir sur le récepteur des androgènes et le récepteur ER $\alpha$ .

La FSH agit conjointement avec la testostérone intratesticulaire au niveau des cellules de Sertoli des tubes séminifères pour amplifier la spermatogenèse. La cellule de Sertoli sécrète également de façon indépendante de l'inhibine B dont la production double sous l'effet de la FSH.

Plusieurs mécanismes permettent de réguler l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire :

- L'inhibine B produite par les cellules de Sertoli régule la sécrétion hypophysaire de FSH par un rétrocontrôle négatif. Elle n'a pas d'effet direct sur l'hypothalamus ;

- L'augmentation du taux de testostérone circulant va inhiber la sécrétion de la GnRH et des gonadotrophines. En effet, la majeure partie de l'action inhibitrice de la testostérone passe par sa conversion par l'aromatase en œstradiol dans l'hypothalamus. L'œstradiol, par l'activation de son récepteur ER $\alpha$ , réduit la fréquence des pulses de GnRH *via* probablement une action indirecte au niveau des neurones à kisspeptine. Ainsi l'œstradiol exerce un effet inhibiteur direct sur les cellules gonadotropes hypophysaires. Les deux actions contribuent à une diminution de l'amplitude des pulses de LH chez l'homme;

- La leptine intervient également au niveau de l'axe en activant son récepteur LEPR sur les neurones à kisspeptine ;

- La prolactine quant à elle exerce un effet antigonadotrope au niveau hypothalamique. Le mécanisme d'action s'exercerait au niveau du neurone à kisspeptine. En effet, seuls quelques neurones à GnRH expriment le récepteur à la prolactine. Chez le rongeur, l'hyperprolactinémie induit un dysfonctionnement de la GnRH, qui est corrigé par l'administration de kisspeptine. Ces résultats sont donc en faveur d'une action indirecte de la prolactine sur les neurones à GnRH, via les neurones à kisspeptine (**Bertrand-Delepine *et al.*, 2016**).

### III. SPERMIOGENESE

Elle correspond au processus de différenciation des spermatides en spermatozoïdes capable de se déplacer et de féconder (**Rousseaux *et al.*, 2003**). Elle est caractérisée par des transformations morphologiques radicales :

- la formation du flagelle,
- le développement de l'acrosome,

- la condensation des chromosomes et des protéines du noyau pour former la tête du spermatozoïde,
- le largage des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère (la spermiation).

## **I.V. SPERME**

Le sperme est un liquide biologique expulsé du corps lors de l'éjaculation. Il est constitué des spermatozoïdes et du plasma séminal.

### **IV.1. Spermatozoïde**

Le spermatozoïde est la cellule reproductrice ou gamète mâle. Il intervient dans la reproduction sexuée. Il est long d'environ 60  $\mu\text{m}$  et il est constitué de trois grandes parties : la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle (**Figure 4**).

Les spermatozoïdes possèdent plusieurs caractéristiques physiologiques indispensables à la fécondation. Il s'agit de :

- la mobilité qui est une propriété essentielle, qui conditionne le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Ceux-ci sont capables de se déplacer grâce aux mouvements de leur flagelle ;
- la fécondance qui désigne l'ensemble des propriétés du spermatozoïde le rendant apte à toutes les étapes de la fécondation. Ces propriétés sont : la mobilité, l'intégrité de la morphologie de l'ADN.
- la vitalité qui correspond au nombre de spermatozoïdes vivants dans un éjaculat
- l'activité métabolique qui est quasi nulle. Il n'y a pas de synthèse d'ARN, comme en témoignent la compaction de la chromatine ainsi que l'absence de nucléoles et de pores nucléaires ; il n'y a pas de synthèse de protéines, comme en atteste l'absence de ribosomes. Seule persiste l'activité respiratoire des mitochondries, le mouvement flagellaire exigeant un apport important d'ATP.
- l'hétérogamétie ou la digamétie ; la méiose en séparant les 2 éléments de la paire XY, fournit en nombre égal des spermatozoïdes à 22 autosomes + X et d'autres à 22 autosomes + Y.

#### **IV.1.1. Tête du spermatozoïde**

Elle est grossièrement ovoïde, légèrement aplatie et un peu effilée vers l'avant. Elle est constituée d'un noyau et d'un acrosome. Ceux-ci sont enveloppés par une mince couche hyaloplasmique et par la membrane plasmique.

- L'acrosome est long de 4 à 5  $\mu\text{m}$  et large de 1,5 à 3  $\mu\text{m}$ . Il contient de nombreuses enzymes hydrolytiques qui interviendront dans la traversée des enveloppes de l'ovocyte.

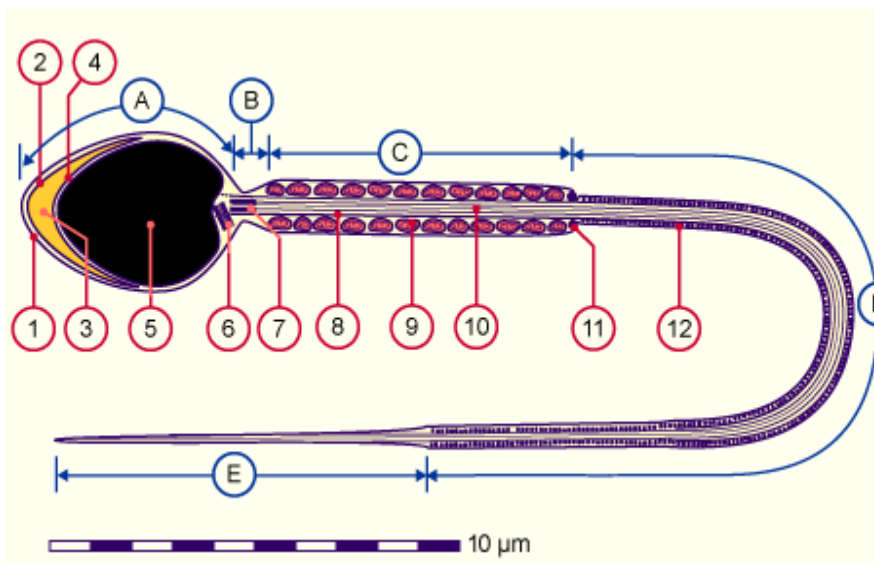
- Le noyau occupe la plus grande partie de la tête et ne possède pas de nucléoles. Il est entouré par une enveloppe nucléaire de structure classique mais dépourvue de pores. Il renferme les informations génétiques.
- Le hyaloplasme est représenté par un espace sous-acrosomal et un espace péri-acrosomal. Il ne contient aucun organite, mais en arrière de l'acrosome il est condensé en une plaque circulaire : la cape post-acrosomale.
- La membrane plasmique est classique et sans particularité morphologique.

#### **IV.1.2. Pièce intermédiaire**

La pièce intermédiaire est constituée d'une gaine de mitochondries à disposition hélicoïdale qui fournit l'énergie nécessaire aux mouvements des spermatozoïdes. Elle présente un filament axial ou axonème qui comporte 9 doublets de microtubules périphériques et un doublet central. Elle est séparée de la tête par le col qui est la zone de jonction entre la tête et le flagelle. C'est une région très complexe dans laquelle se distingue deux constituants essentiels : un appareil centriolaire et une pièce connective. Ils sont entourés par une mince couche de hyaloplasme et par la membrane plasmique. La limite inférieure de la pièce intermédiaire correspond à la terminaison de l'hélice mitochondriale au niveau de l'annulus.

#### **IV.1.3. Flagelle**

Le flagelle correspond à la partie du spermatozoïde qui ondule et qui lui permet de se déplacer. Il comprend une pièce principale et une pièce terminale. La pièce principale a une structure particulière, identique sur toute sa longueur. Elle comporte une gaine de fibres denses externes autour de l'axonème. Une gaine fibreuse, formée par l'association d'anneaux semi-circulaires, entoure l'ensemble axonème-fibres. La pièce terminale ne contient plus que les microtubules de l'axonème.



- 1 Membrane plasmique
  - 2 Membrane acrosomiale externe
  - 3 Acrosome
  - 4 Membrane acrosomiale interne
  - 5 Noyau
  - 6 Centriole proximal
  - 7 Restes du centriole distal
  - 8 Faisceaux longitudinaux extérieurs denses
  - 9 Mitochondrie
  - 10 Axonème
  - 11 Annulus
  - 12 fibres denses externes
- A Tête
  - B Collet
  - C Pièce intermédiaire
  - D Pièce principale
  - E Pièce terminale

**Figure 4 :** Spermatozoïde.

(Source :

<http://www.embryology.ch/francais/cgametogen/popupgametogen/03spermato/spermatomehr.html> :  
consulté le 25/11/2017)

## IV.2. Plasma séminal

Le plasma séminal est le fluide composant la majorité du sperme. Il est sécrété par la prostate, les vésicules séminales, l'épididyme et les glandes de Cowper. Chacun des segments des voies génitales mâles fabrique une molécule qui lui est propre (**Rollet, 1999**). De nombreuses molécules entrent dans sa composition. Il s'agit : des glucides libres et liés (glucose, fructose, sorbitol), d'acides organiques (acide citrique, acide ascorbique), de substances azotées non protéiques (polyamines, carnitine, cholines), de protéines sériques (albumine, immunoglobulines, hormones peptidiques), de protéines cellulaires (calmoduline, AMPc), de protéines spécifiques (lactoferrine, inhibiteurs de protéases), de lipides (prostaglandines, phosphorylcholine, cholestérol, stéroïdes), d'enzymes (protéases, glucosidases, phosphatases, transférases), de composés minéraux (Zn, Ca, Mg.), de facteurs de croissance ( $TGF_{\alpha}$ ,  $TGF_{\beta}$ , IGFI, IGFII, EGF...), de cytokines (IL6,  $TNF_{\alpha}$ ...), de composés organiques retrouvés à des concentrations très élevées qui gèrent en grande partie l'osmolarité du plasma séminal, de vitamines (**Juyena et Stelletta, 2012**).

Le plasma séminal joue plusieurs rôles dans le maintien de la fertilité masculine. Il est chargé de nourrir et de véhiculer les spermatozoïdes jusqu'au vagin lors d'un rapport sexuel. Il les protège contre l'environnement hostile du vagin en créant un milieu de type tampon alcalin. Le plasma séminal intervient dans la coagulation de l'éjaculat et la constitution d'un dépôt de spermatozoïdes dans le vagin. Il permet le stockage d'inhibiteurs de la capacitation, l'activation et l'amélioration de la mobilité des spermatozoïdes, la liquéfaction de l'éjaculat après 15 à 20 minutes (**Rollet, 1999**).

## V. INFERTILITE MASCULINE

Elle se définit comme étant l'absence de grossesse après au moins un an de rapports sexuels non protégés et réguliers (**Leridon, 1982**). Elle est l'impossibilité pour un homme de procréer à cause d'un défaut de son sperme. Elle est caractérisée par un faible volume de sperme, un déficit de la quantité, une mauvaise mobilité, une morphologie anormale ou un défaut de fonctionnement des spermatozoïdes. Les causes de l'infertilité masculine sont nombreuses (**Traoré et al., 2008**). Elles peuvent être d'origine génétique, liées à un varicocèle, à la consommation de l'alcool et de la cigarette, aux oreillons, à une radiothérapie, à certains traitements médicaux, aux infections sexuellement transmissibles (IST), au stress et aux déficiences nutritionnelles (**May-Panloup et al., 2001 ; Mc Elreavey et al., 2002**). Il existe d'autres facteurs tels que les problèmes immunitaires qui empêchent la progression des spermatozoïdes à travers les voies génitales féminines. Les atteintes de la spermatogénèse peuvent aussi être à l'origine de l'infertilité masculine. Elles peuvent avoir des causes génétiques ou somatiques comme l'indique le **tableau i en annexe**. Cependant, il existe des cas d'infertilité masculine d'origine inexplicée (**Pasqualotto et al., 2008**).



L'examen de référence permettant d'identifier les différentes anomalies du sperme est le spermogramme. Il permet l'étude des paramètres quantitatifs et qualitatifs du sperme. Le sperme normal est dit normozoospermique. Il doit répondre aux normes de l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS 2010**) qui offrent un cadre d'interprétation pour chacun des paramètres du sperme étudié. Ces normes sont décrites au **tableau ii en annexe**. Les normes de l'OMS conduisent à une standardisation du spermogramme et permettent de définir les différentes pathologies du sperme.

En cas d'anomalies du spermogramme, des examens complémentaires permettent de situer le niveau et la cause de l'infertilité. Ceux-ci peuvent comporter :

- un caryotype,
- des dosages hormonaux,
- des recherches immunologiques,
- une biopsie testiculaire,
- la biochimie séminale,

## **VI. AZOOSPERMIE**

L'azoospermie est une cause de l'infertilité masculine (**Coat *et al.*, 2011**). Elle est caractérisée par une absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat sur deux spermogrammes à trois mois d'intervalle car c'est la durée de la spermatogenèse. Son diagnostic est formel lorsqu'aucun spermatozoïde n'est retrouvé dans le culot de sperme après centrifugation de la totalité de l'éjaculat. La centrifugation permet de s'assurer que le sperme ne contient pas de rares spermatozoïdes.

Ce trouble peut être d'origine génétique ou apparaître à la suite d'une infection testiculaire, ou après l'utilisation de certains traitements. Il peut être dû à une pathologie testiculaire (**Traoré *et al.*, 2008**).

L'azoospermie peut être soit excrétoire, soit sécrétoire.

- L'azoospermie excrétoire (ou obstructive) ; elle est due à un obstacle qui empêche les spermatozoïdes fabriqués dans le testicule de passer dans le sperme éjaculé.
- L'azoospermie sécrétoire (ou non obstructive) correspond à un défaut de la fabrication des spermatozoïdes dans le testicule. Dans ce cas, elle peut être d'origine testiculaire dite « basse » ou d'origine hypothalamo-hypophysaire dite « haute ».

L'exploration biologique de l'azoospermie fait intervenir en plus du spermogramme, des examens complémentaires tels que : les dosages hormonaux, la biochimie séminale.

### **VI.1. Dosages hormonaux**

Tous les patients azoospermes bénéficient de dosages hormonaux pour évaluer la fonctionnalité des compartiments sertoliens et leydigiens. En effet, les interactions complexes de ces deux

compartiments sont nécessaires au bon déroulement de la spermatogenèse. La fonction sertolienne est évaluée par des dosages de la FSH et de l'inhibine B sérique. La fonction leydigienne est explorée par un dosage de la testostérone totale. En cas d'hypotestostéronémie, un dosage de la LH et de la prolactine complète le bilan étiologique de l'hypogonadisme.

### **VI.1.1. Dosage de la FSH**

Il permet d'orienter le praticien vers une origine sécrétoire de l'azoospermie. En effet, la FSH stimule la production des spermatozoïdes par les testicules. Ainsi le dosage de la FSH en cas d'azoospermie peut présenter plusieurs valeurs :

- La valeur normale de la FSH indique que le testicule fabrique normalement des spermatozoïdes, mais il y a un obstacle à leur passage dans l'éjaculat.
- La valeur élevée de la FSH traduit le fait que le testicule ne fabrique pas assez de spermatozoïdes (**Merdassi et al., 2011**). Cela peut être la conséquence d'une insuffisance testiculaire primitive. Les testicules sont alors atteints et il y a un défaut de production de spermatozoïdes et de la testostérone.
- Un taux inférieur à la normale de la FSH est le signe d'un hypogonadisme. En effet, l'hypogonadisme chez l'homme est un syndrome clinique qui résulte du défaut de la production testiculaire de la testostérone et / ou de sperme.

### **VI.1.2. Dosage de l'inhibine B et de l'hormone anti-müllérienne (AMH)**

Ces hormones sont sécrétées par les cellules de Sertoli. Elles sont indispensables à la spermiogénèse (**Deffieux et Antoine, 2003**). Les taux d'inhibine et d'AMH sont bas dans les azoospermies sécrétoires, et sont généralement normaux dans le cas des obstructives.

### **VI.1.3. Dosage de la testostérone**

Il est le reflet de la fonction endocrine des testicules. Son dosage couplé à celui des gonadotrophines permet le diagnostic d'un hypogonadisme. Cet hypogonadisme peut être soit hypergonadotrope, ou normogonadotrope ou hypogonadotrope. Les manifestations cliniques peuvent inclure une baisse de la libido, des troubles érectiles, une ostéopénie/ostéoporose, et / ou une infertilité (**Xu et al., 2015**). En effet, l'ostéopénie est une baisse de la densité de l'os. Il s'agit d'un état physiologique, précurseur de l'ostéoporose. L'ostéoporose correspond à une maladie diffuse du squelette caractérisée par une diminution de la densité osseuse et des altérations de la micro-architecture des os.

#### **VI.1.4. Dosage de la prolactine**

Il est indiqué lors des troubles de la sexualité avec une perte de la libido ou en cas d'hypoandrisme. L'hypoandrisme est une anomalie qui est caractérisée par la persistance de certains caractères infantiles chez un adulte de sexe masculin.

Si le niveau de la prolactine est augmenté, il faudra rechercher par l'imagerie par résonance magnétique (IRM) un adenome hypophysaire qui n'est pas exceptionnel chez l'homme.

#### **VI.2. Biochimie séminale**

Elle correspond au dosage sur un prélèvement de plasma séminal, de marqueurs spécifiques produits par les différentes glandes de l'appareil génital de l'homme. Elle constitue un complément du spermogramme dans le cadre de l'exploration de l'infertilité masculine. En effet, elle renseigne le clinicien sur l'aspect fonctionnel de l'épididyme, la prostate et les vésicules séminales. Le dosage de ces marqueurs biochimiques peut informer, positivement ou négativement, sur l'existence de phénomènes obstructifs, inflammatoires des voies excrétrices du tractus génital masculin (**Rollet, 1999**). Les marqueurs du plasma séminal témoignant du fonctionnement des glandes annexes sont présentés par le **tableau iii en annexe**. Ces marqueurs sont :

- le zinc, l'acide citrique, les phosphatases acides pour la prostate,
- le fructose pour les vésicules séminales,
- la L-carnitine, l'alpha-glucosidase pour l'épididyme.

Lorsque le taux d'un marqueur biochimique est bas, c'est qu'il existe un obstacle en aval de la partie qui produit cette substance, ou une agénésie qui correspond à une absence de développement de cette partie. Ainsi la diminution d'un des marqueurs biochimiques peut orienter l'azoospermie vers une origine obstructive comme l'indique le **Tableau iv en annexe**. L'intérêt de la biochimie du plasma séminal est donc double. Il permet de vérifier l'intégrité de la voie génitale et de préciser le niveau de l'anomalie (**Rollet, 1999**).

L'environnement biochimique a une grande influence sur les fonctions du spermatozoïde. Aussi il est important d'avoir une connaissance de la composition du plasma séminal afin de mettre en place des techniques de diagnostic et de thérapie de l'azoospermie (**Coulibaly et al., 2014a ; Coulibaly et al., 2014b**).

### **VII. ELEMENTS MINERAUX ET FERTILITE MASCULINE**

Les éléments minéraux forment une vaste famille d'éléments inorganiques que l'on trouve dans notre alimentation. Ils sont pour certains, essentiels à la réalisation de fonctions biologiques vitales (**Kasperczyk et al., 2015**). Ce qui permet de distinguer : les macro-éléments ou les éléments minéraux majeurs et les oligo-éléments ou les éléments en traces. Dans la cellule, les minéraux

interviennent dans une large gamme de fonctions : la minéralisation, le contrôle de l'équilibre en eau. Ils interviennent aussi comme des catalyseurs de plusieurs réactions biochimiques (**Wong et al., 2001**). Ils prennent part au fonctionnement des systèmes hormonaux, musculaire, nerveux et immunitaire.

De nombreux travaux ont permis de les identifier dans le plasma séminal (**Umeyama et al., 1986 ; Rosecrans et al., 1987 ; Sakandé et al., 2012**). Ils interviennent dans le maintien de la fertilité masculine (**Wong et al., 2002**). La qualité du sperme est corrélée à la concentration de certains d'entre eux et leur présence reflète de façon satisfaisante le fonctionnement des glandes accessoires de l'appareil génital mâle telles que la prostate (**Adamopoulos et Deliyannis, 1983 ; Xu et al., 1993 ; Banjoko et Adeseolu, 2013**). Ils sont utilisés dans le traitement et la prévention de l'infertilité masculine (**Wong et al., 2002**). Ils sont aussi indispensables à la régulation de la réaction acrosomique, de la capacitation, et de la mobilité des spermatozoïdes (**Marín-Briggiler et al., 2003 ; Kwon et al., 2013**). Ils peuvent servir d'outils de soutien à l'évaluation de l'infertilité masculine (**Akinloye et al., 2011**).

### **VII.1. Sodium**

Le sodium est un électrolyte ( $\text{Na}^+$ ), c'est-à-dire un sel minéral en circulation dans l'organisme. Il joue un rôle capital dans la régulation de la pression osmotique, de l'équilibre hydro-électrolytique et de la masse hydrique de l'organisme (**Torres-Flores et al., 2008 ; Martins et al., 2014**). C'est le principal ion des liquides extra-cellulaires. Les échanges de sodium entre la cellule et le milieu extérieur se font à travers des structures protéiques situées au niveau de la membrane plasmique. Ainsi le sodium entre dans la cellule par des canaux voltage-dépendants et récepteur-dépendants, des échangeurs, des cotransporteurs ; il en sort grâce à la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

### **VII.2. Potassium**

Le potassium est un minéral essentiel et un électrolyte majeur. Il est vital pour la survie des cellules de l'organisme. En association avec le sodium, le calcium et le magnésium, il maintient l'équilibre ionique entre l'intérieur et l'extérieur des cellules. Il participe également aux mouvements d'eau se déroulant dans les cellules (avec les ions sodium). Sa fonction première est de maintenir un équilibre optimal des fluides et un bon niveau du pH dans l'organisme. De plus, il intervient dans la synthèse des protéines, ainsi que dans celle des glucides. Le potassium est principalement intracellulaire. Il joue un rôle déterminant dans la repolarisation cellulaire. En effet, la dépolarisation consécutive à l'entrée dans la cellule de sodium et de calcium est suivie de la repolarisation par la sortie de potassium. Le retour de la cellule à l'état d'équilibre initial est assuré

par la pompe membranaire  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Les échanges entre potassium cellulaire et extracellulaire sont permanents, et s'effectuent par différentes structures (**Li *et al.*, 2004**) :

- la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase
- des transporteurs, en particulier des cotransporteurs comme la  $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$
- des canaux dont l'ouverture permet un transfert passif de  $\text{K}^+$ . Il s'agit des canaux

$\text{K}^+$  dépendants du potentiel, des canaux couplés aux ions sodium et surtout calcium, des canaux couplés aux médiateurs tels que l'acétylcholine et l'adénosine.

### VII.3. Chlorure

Le chlorure se trouve dans les liquides extracellulaires de notre organisme. Très souvent associé au sodium et au potassium, il permet de répartir l'eau dans notre organisme, de réguler la pression osmotique, de participer à la neutralité électrique de l'organisme, de maintenir l'équilibre acido-basique, et de favoriser le transport du  $\text{CO}_2$  dans le sang (**Wertheimer *et al.*, 2008 ; Dussol, 2010**). L'échange entre le milieu extérieur et les cellules à travers la membrane plasmique s'effectue grâce à des canaux, des co-transporteurs, des échangeurs, des récepteurs canaux.

### VII.4. Calcium

Le calcium est un messager intracellulaire ubiquitaire contrôlant de nombreux processus tels que la dépolarisation, la contraction des muscles lisses ou striés, la sécrétion hormonale, l'activation d'enzymes, les transports intracellulaires, et l'activation de transports ioniques (**Shukla *et al.*, 2012**). La concentration extracellulaire de calcium, est élevée comparativement à celle intracellulaire. Elle est régulée de sorte qu'elle ne subit que de très faibles variations. La concentration en calcium intra cytoplasmique reste faible, car la cellule possède des moyens de l'expulser à l'extérieur. Elle est aussi capable de piéger le calcium dans certains organites intracellulaires comme le réticulum endoplasmique ou les mitochondries. Le gradient électrochimique est en faveur d'une entrée du calcium dans le cytosol. Ainsi, la signalisation cellulaire du calcium est liée à une augmentation de sa concentration cytosolique qui peut être caractérisée par son origine, son amplitude, sa durée et sa fréquence (**Shukla *et al.*, 2012**).

### VII.5. Magnésium

Le magnésium est un ion ubiquitaire qui intervient dans de nombreux mécanismes biochimiques et fonctions physiologiques. Il représente au plan quantitatif le deuxième cation intracellulaire après le potassium. Il est indispensable au fonctionnement de nombreuses enzymes cellulaires dont la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (**Abou-Shakra *et al.*, 1989**). La concentration en magnésium libre dans la cellule est à peu près égale à la concentration extracellulaire. Il n'y a donc que peu ou pas de gradient de

diffusion entre la cellule et le plasma. Au niveau cellulaire, il contrôle et régule l'entrée du calcium dans la cellule et les liquides intra cellulaires.

## VII.6. Phosphore

Le phosphore existe dans l'organisme sous forme minérale. Il s'agit de l'acide orthophosphorique et de ses différents sels, souvent désignés sous le terme de phosphore inorganique. Le phosphore se présente sous diverses formes organiques : phospholipides, phosphoprotéines, acides nucléiques, adénosine triphosphate (ATP), nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate, 2,3-bisphosphoglycérate... Le phosphore contribue au maintien de l'équilibre acido-basique (pH) et participe à la plupart des réactions biochimiques de l'organisme, notamment sous forme d'ATP (la principale forme de stockage et de transport d'énergie dans la cellule). Enfin, c'est un constituant essentiel de divers composés biologiques (ADN, ARN, phospholipides des membranes cellulaires).

## VII.7. Fer

Le fer est un élément essentiel à la vie de tout organisme. Il intervient en effet dans de nombreuses fonctions métaboliques et de signalisation. Il peut adopter deux formes ioniques différentes  $Fe^{2+}$  ou  $Fe^{3+}$ . Cette flexibilité fait du fer un acteur important des réactions d'oxydo-réduction de la cellule. Ainsi, il va servir de centre catalytique d'enzymes intervenant dans ce type de réactions. Ces enzymes interviennent dans des processus cellulaires centraux comme les transports d'électrons, l'activation de l'oxygène, la réduction du peroxyde, la synthèse des nucléotides ou des acides aminés, la synthèse de l'ADN ou encore la photosynthèse (**Aydemir et al., 2006**). Cependant, bien que bénéfique à des niveaux normaux, l'excès de fer devient toxique en raison de sa capacité à catalyser la production de radicaux libres et d'entraîner ainsi des dommages aux macromolécules cellulaires.

## VIII. STRESS OXYDATIF

Le métabolisme cellulaire produit à l'état physiologique une variété d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**De Lamirande et al., 1997**). Les ERO sont des espèces chimiques oxygénées telles que des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes, rendus chimiquement très réactifs par la présence d'électrons de valence non appariés. Les radicaux libres sont représentés par le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), les anions superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ), les alkylperoxydes ( $RO_2^{\bullet}$ ). Les espèces non radicalaires correspondent au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et aux hydroperoxydes ( $RO_2H$ ).

La formation des ERO est une conséquence normale du métabolisme aérobie chez l'homme. Les sources métaboliques les produisant sont nombreuses. Il s'agit de la chaîne respiratoire mitochondriale, des cytochromes P-450, de l'activité de la NADPH oxydase, la myéloperoxydase,

l'oxyde nitrique synthase (NOS), la xanthine oxydase. Les ERO sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme (**De Lamirande et al., 1997**). Mais, le déséquilibre entre la production des ERO et les capacités cellulaires antioxydantes peut être à l'origine du stress oxydant. Les effets de celui-ci sont retrouvés dans tout l'organisme et dans des pathologies très variées. Il est à l'origine d'altérations moléculaires et cellulaires irréversibles. En effet, les ERO ont une très grande réactivité vis à vis des lipides, des protéines et de l'ADN (**Laudat et al., 1999 ; Therond, 2006**).

- **Oxydation des protéines par les ERO**

Elle peut avoir lieu sur la chaîne polypeptidique et les chaînes latérales nucléophiles ou redox sensibles des acides aminés. Dans les conditions physiologiques, les cibles majeures des ERO sont les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine), les acides aminés basiques (arginine, lysine) et les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane). Les protéines modifiées par l'oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (**Therond, 2006**).

- **Oxydation de l'ADN**

Les ERO agissent directement sur l'acide désoxyribonucléique (ADN) ; entraînant la modification des bases puriques et pyrimidiques. Il s'agit des cassures simples ou doubles de la chaîne oligonucléotidique, des pontages avec des résidus protéiques (**Wright et al., 2014**). Les dérivés de la réaction des ERO avec l'ADN sont très nombreux. Il s'agit du glycol de thymine, de la 8-hydroxyguanine, de la 8-hydroxy-adénine, du formamido-pyrimidine, du 5-hydroxyméthyl-uracil, de la cytosine-glycol. Mais les bases guanines sont les sites privilégiés de l'oxydation de l'ADN. Ce sont les cibles préférentielles des réactions de transfert d'électrons, elles sont également modifiées par les radicaux hydroxyles.

- **Oxydation des lipides**

Les acides gras polyinsaturés des lipides sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle. Il est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction est appelée la peroxydation lipidique. Celle-ci initie une réaction en chaîne car le radical peroxy formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. La peroxydation lipidique se déroule en trois étapes :

- la phase d'initiation par déshydrogénation

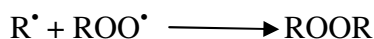
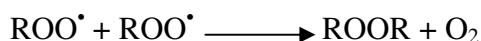
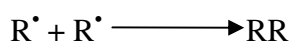


- la phase de propagation en présence d'O<sub>2</sub>



- la phase de terminaison par dimérisation de R<sup>•</sup>

Les radicaux formés précédemment réagissent entre eux pour conduire à plusieurs produits qui ne sont plus des radicaux libres :



Nous obtenons des peroxydes ROOR à l'étape finale. La peroxydation lipidique conduit à la formation de produits primaires comme les hydroperoxydes, ou de produits secondaires terminaux comme le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonéal (4-HNE) et les isoprostanes (**Therond, 2006**).

Le MDA est un aldéhyde réactif. Il est présent naturellement dans les tissus, où il est une manifestation du stress oxydant. Il est issu notamment de l'action des ERO sur les acides gras polyinsaturés. Il réagit aussi avec la désoxyadénosine et la désoxyguanosine pour former des adduits à l'ADN (**Laudat *et al.*, 1999 ; Ben Ali *et al.*, 2012**).

La peroxydation lipidique a des conséquences multiples en induisant une diminution de la fluidité des membranes plasmiques, une augmentation de la charge négative de surface, et en perturbant les membranes des organites cellulaires (**Ben Ali *et al.*, 2012**). Elle entraîne ainsi une inactivation des enzymes membranaires, une oxydation des groupements thiols, une augmentation de la perméabilité membranaire, un gonflement des mitochondries avec l'inhibition de la chaîne respiratoire et la perte du cytochrome C.

### VIII.1. Antioxydants

Les antioxydants ont pour rôle d'arrêter le processus d'oxydation en neutralisant les radicaux libres, afin de réduire leur nocivité (**Nouri *et al.*, 2008 ; Shiva *et al.*, 2011**). Pour lutter contre l'excès de la production des ERO, l'organisme dispose d'un arsenal important d'enzymes antioxydantes ubiquitaires à savoir les superoxydes dismutases (SOD), la glutathion peroxydase



(GPx) et la catalase (CAT). Il existe également des molécules antioxydantes hydrosolubles que sont le glutathion, la vitamine C, l'acide urique. Les molécules antioxydantes liposolubles sont représentées par la vitamine E, les caroténoïdes, la bilirubine. Toutes ces molécules interviennent particulièrement au niveau des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques (**Shiva et al., 2011 ; Mahanta et al., 2012**).

## VIII.2. Stress oxydatif et qualité du sperme

Les ERO sont produites de façon naturelle dans l'appareil génital masculin et y jouent de nombreux rôles (**De Lamirande et al., 1997**). Les pro-oxydants et les antioxydants sont en équilibre dans le sperme. La présence de concentrations modérées et contrôlées des ERO est indispensable aux processus d'hyperactivation, de maturation, de capacitation des spermatozoïdes. La réaction acrosomique, la mobilité, la fertilisation et l'adhérence des spermatozoïdes à l'ovocyte requiert aussi la présence des ERO (**De Lamirande et al., 1997**).

Toutefois, des facteurs endogènes et exogènes peuvent rompre cet équilibre, en stimulant la production des ERO et / ou en diminuant les défenses anti-oxydantes (**Pons-Rejraji et al., 2009**). Le stress oxydatif est aujourd'hui décrit comme une des causes majeures de l'infertilité masculine.

Dans le sperme, les sources internes de la production des ERO sont les mitochondries qui génèrent du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le système NADPH oxydase de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Cette capacité de production des ERO est plus importante dans les cellules germinales immatures, notamment quand il y a un résidu cytoplasmique important. Les sources extérieures de la production des ERO sont les globules blancs. Ceux-ci produisent le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'oxygène ( $O_2$ ). Les phagocytes et les lymphocytes produisent les superoxydes qui semblent utiliser la NADPH oxydase comme enzyme. Le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont généralement retrouvés dans le sperme. L'anion superoxyde est peu réactif, et est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), spontanément ou par l'action de la superoxyde dismutase (SOD). D'autres cellules dans l'appareil reproducteur mâle, interviennent dans la production de faibles quantités d'ERO. Il s'agit des cellules endothéliales, des fibroblastes, des cellules mésangiales, et des cellules musculaires lisses vasculaires.

Des concentrations élevées des ERO dans le sperme affectent la qualité des spermatozoïdes qui sont particulièrement sensibles au stress oxydatif et induit de nombreux dégâts. Il s'agit ainsi :

- d'un taux élevé de spermatozoïdes présentant un ADN fragmenté,
- d'une variation du potentiel membranaire mitochondrial,
- de valeurs altérées de la concentration, de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes,
- d'une viscosité accrue du plasma séminal.

Toutefois, ces anomalies sont également associées à différentes pathologies et ne peuvent être considérées comme des indicateurs potentiels du stress oxydant. Mais certaines altérations de la qualité spermatique sont qualifiées de signes sentinelles du stress oxydatif (**Agarwal *et al.*, 2006 ; Gharagozloo et Aitken, 2011**)

Pour lutter contre le stress oxydatif le sperme contient de nombreuses substances antioxydantes. Il s'agit des antioxydants enzymatiques (SOD, GSH, la catalase) et des antioxydants non enzymatiques tels que l'acide ascorbique, l' $\alpha$ -tocopherol, l'acide urique, l'albumine, la carnitine, les caroténoïdes, les flavonoïdes et la coenzyme Q10 (**Giannattasio *et al.*, 2002 ; Nouri *et al.*, 2008 ; Shiva *et al.*, 2011**). Certaines sont présentes dans les spermatozoïdes, mais le plasma séminal constitue la meilleure protection (**Nouri *et al.*, 2008 ; Kand'ár *et al.*, 2011**).

Il est possible de mesurer la production des radicaux libres, l'activité antioxydante totale (TAC) et les effets biologiques du stress oxydatif. En pratique clinique, l'évaluation du stress oxydatif est faite par la mesure des produits de dégradation des lipides et par la mesure des capacités de protection (**Camejo *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2004 ; Abdul-Rasheed, 2010**). La détermination de l'activité antioxydante totale (TAC) permet d'explorer le statut antioxydant du sperme. Elle permet de déterminer la capacité du sperme à neutraliser les ERO (**Ko *et al.*, 2014**).

## **IX. VITAMINES**

Les vitamines sont des composés organiques nécessaires à la vie. Elles sont apportées par l'alimentation en faible quantité (**Nouri *et al.*, 2008 ; Benedetti *et al.*, 2012 ; Gvozdjâková *et al.*, 2015**). Bien que l'alimentation soit la source principale, d'autres origines existent. Par exemple, la peau synthétise la vitamine D lorsqu'elle est exposée aux rayons ultraviolets et la vitamine K est formée par la flore intestinale. Les vitamines sont indispensables à la croissance et au fonctionnement normal de l'organisme (**Nouri *et al.*, 2008 ; Benedetti *et al.*, 2012 ; Gvozdjâková *et al.*, 2015**). Elles exercent leurs effets principalement de trois manières : comme coenzyme pour les vitamines hydrosolubles, anti-oxydants pour les vitamines C et E et hormones dans le cas des vitamines A et D (**Nouri *et al.*, 2008 ; Benedetti *et al.*, 2012 ; Gvozdjâková *et al.*, 2015**). Les vitamines diffèrent par leur structure, leur source, les besoins journaliers et leur mode d'action. On les classe en deux groupes selon leur solubilité :

- les vitamines liposolubles à savoir les vitamines A, D, E et K.
- les vitamines hydrosolubles qui sont les vitamines C, B1, B2, PP, B5, B6, B8, B9, B12.

## IX.1. Vitamine A

La vitamine A se présente dans l'organisme sous la forme de rétinol et de rétinal au niveau de la rétine, d'acide rétinoïque dans les os et les muqueuses ou de palmitate de rétinyle dans les réserves stockées dans le foie. Le **tableau v en annexe** présente la structure de la vitamine A.

Bien que le rétinol et le rétinal soient stockés dans l'organisme, l'acide rétinoïque ne l'est pas. A côté de son rôle spécifique dans la synthèse d'un pigment rétinien essentiel à la vision nocturne appelé la rhodopsine, la vitamine A intervient essentiellement dans la croissance et le développement de l'organisme, la différenciation des spermatozoïdes et des ovocytes, l'entretien du squelette et des différents épithéliums notamment les muqueuses (**Ball, 2008**). Les rétinoïdes naturels sont apportés à l'organisme par l'alimentation. Il s'agit des caroténoïdes et des bêta-carotènes contenu dans les carottes et les œufs, les rétinylesters contenus dans la viande, le lait, le foie.

Au sein de l'intestin, les rétinylesters de l'alimentation sont hydrolysés en rétinol. Les caroténoïdes sont hydrolysés dans un premier temps en rétinal grâce à une bêta-carotène dioxygénase. Le rétinal est transformé en rétinol sous l'action d'une rétinaldéhyde réductase. Le rétinol circule lié à une protéine de 21 kDaltons, le retinol binding protein (RBP). D'autres rétinoïdes que le rétinol circulent dans le plasma à des concentrations nanomolaires. Il s'agit de l'acide 13-cis-rétinoïque, l'acide rétinoïque tout-trans (ARTT), l'acide 4-oxo-rétinoïque tout trans, et du tout-trans-retinoyl- $\beta$ -glycuronide.

Au niveau des cellules cibles, le complexe circulant rétinol-RBP se fixe à des récepteurs membranaires spécifiques, le gène codant ces récepteurs est le STRA6.

Après fixation, le complexe se dissocie et seul le rétinol pénètre au sein de la cellule cible. Pour bien pénétrer, le rétinol doit subir l'action d'une lécithine : rétinol acyltransférase (LRAT).

Les métabolites actifs de la vitamine A sont donc synthétisés au sein des cellules cibles.

Dans le cytoplasme, le rétinol va subir plusieurs voies de métabolisation après s'être lié à un récepteur cytosolique qui est le Cellular Retinol Binding Protein (CRBP) (**Berbis, 2010**).

## IX.2. Vitamine E

Les vitamines E sont constituées d'un noyau 6-chromanol et d'une chaîne latérale isoprénoïde de 16 atomes de carbone, dont trois asymétriques comme l'indique le **tableau v en annexe**. Ainsi la vitamine E recouvre un ensemble de huit molécules organiques dont quatre tocophérols et quatre tocotriénols. La forme biologique la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol et celle la plus abondante dans l'alimentation est le  $\gamma$ -tocophérol. La vitamine E est l'antioxydant liposoluble majeur des lipides, elle est transportée essentiellement par les lipoprotéines de basse densité (LDL), qu'elle protège

contre les phénomènes de la peroxydation lipidique touchant les acides gras polyinsaturés (**Bramley et al., 2000**).

Les sources de la vitamine E sont alimentaires. Les aliments riches en vitamine E sont les graines de tournesol, les amandes, les noisettes et les autres fruits à coques, le son des céréales, les arachides, l'avocat, la pâte de tomate en conserve.

La vitamine E est souvent utilisée comme conservateur alimentaire. Ces conservateurs permettent d'éviter le rancissement des aliments par les radicaux libres. Il s'agit des conservateurs E306 à E309. La vitamine E exerce une action favorable sur l'activité des glandes génitales et pour cette raison elle fut surnommée "le facteur anti stérilité" (**Gvozdjaková et al., 2015**). L' $\alpha$ -tocophérol aurait un rôle dans la prolifération des cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux, modulerait le métabolisme de l'acide arachidonique par la phospholipase A2 et interviendrait dans l'activité de la protéine kinase C.

La vitamine E inhiberait la formation de prostaglandines et de thromboxanes intervenant ainsi dans les processus inflammatoires et d'agrégation plaquettaire. Elle augmenterait la production de substances endogènes vasodilatatrices, l'adhésion des monocytes et diminuerait la flambée respiratoire des phagocytes.

Le tocophérol porteur d'un radical peut réagir avec un nouveau radical libre pour former une espèce neutre, ou être régénéré par la vitamine C, le glutathion ou la coenzyme Q10.

L'action de la vitamine E contre les ERO est caractérisée par :

- la prévention des phénomènes oxydants,
- l'inactivation des ERO en transformant ceux-ci en éléments stables,
- en captant l'électron radicalaire des éléments hydrophiles que sont l'acide ascorbique, le glutathion et des éléments hydrophobes comme la vitamine E, la caroténoïdes, la flavonoïdes, l'ubiquinol, la bilirubine, la mélatonine,
- ou encore en réparant les lésions induites par les ERO.

La vitamine E a la capacité de capter et de stabiliser par résonance l'électron célibataire des radicaux libres, suivant la réaction :



( $\text{LOO}\cdot$  : radical libre lipidique)

### **IX.3. Vitamine D**

La vitamine D présente une double origine : exogène et endogène. L'origine exogène de la vitamine D correspond à l'apport alimentaire quand à celle endogène, elle résulte d'une néosynthèse

intervenant au niveau de l'épiderme (**Holick, 2007**). La vitamine D est présente dans notre alimentation sous deux formes : la vitamine D<sub>2</sub> ou ergocalciférol, produite essentiellement par les végétaux et les champignons, et la forme D<sub>3</sub> ou cholécalciférol d'origine animale. Ces deux formes sont liposolubles et relativement stables, notamment à la chaleur. La vitamine D<sub>2</sub> ou ergocalciférol est d'origine végétale. Elle se trouve dans la plupart des aliments. La vitamine D<sub>3</sub> ou cholécalciférol est synthétisée au niveau de la peau par l'action des rayons ultraviolets sur le cholestérol. Elle est également présente dans les aliments d'origine animale comme les huiles de poissons, les poissons, le beurre, les œufs, les foies d'animaux et le lait (**Landrier, 2014**).

La principale source de la vitamine D<sub>3</sub> est la synthèse endogène qui se déroule au niveau de l'épiderme, après une exposition aux rayonnements ultraviolets B (UVB) fournis par l'ensoleillement. Elle est réalisée à partir du 7-déhydrocholestérol, un intermédiaire de synthèse du cholestérol, présent dans les membranes des cellules du derme et de l'épiderme. L'énergie fournie par les rayons UVB permet sa transformation en prévitamine D<sub>3</sub>, elle-même rapidement convertie sous l'effet de la chaleur en vitamine D<sub>3</sub>, libérée dans la circulation. Cette synthèse de vitamine D est donc étroitement liée à l'exposition solaire (**Landrier, 2014**).

La vitamine D d'origine alimentaire est incorporée dans des micelles mixtes et est absorbée au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle. Ce transport fait intervenir des transporteurs du cholestérol (CD36, NPC1L1 et SR-B1).

Après son transport, la vitamine D gagne le plasma en se fixant aux chylomicrons pour atteindre le foie. La vitamine D néo synthétisée se lie à la protéine de liaison de la vitamine D (VDBP) qui est une  $\alpha$ 2-globuline. Après son transport dans la circulation sanguine, liée aux chylomicrons ou à la VDBP, la vitamine D est captée au niveau hépatique et est hydroxylée en 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D) en présence de plusieurs enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP2R1, CYP27A1, CYP3A4 et CYP2J2).

Après cette première hydroxylation, la 25(OH)D circule dans le sang, majoritairement liée à la VDBP. Ce complexe VDBP-25(OH)D est endocyté au niveau des cellules du tubule proximal rénal, après filtration glomérulaire, par une protéine de surface appelée mégaline. Une fois dans la cellule, la VDBP est dégradée. Le transport intracellulaire de la 25(OH)D pourrait faire intervenir des transporteurs intracellulaires de la vitamine D (IDBP). La 25(OH)D est ensuite soit réexcrétée dans la circulation sanguine, soit transloquée à la mitochondrie pour subir une hydroxylation en position 1, aboutissant ainsi à la synthèse du 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25(OH)<sub>2</sub>D) ou calcitriol, considérée comme la principale forme active de la vitamine D. Cette hydroxylation en position 1 est assurée par le cytochrome P450 27B1 (CYP27B1).

L'activité du CYP27B1 est très étroitement régulée par différents paramètres du métabolisme phosphocalcique. Elle est principalement stimulée par la parathormone (PTH) et une calcémie

basse, tandis qu'elle est inhibée par le Facteur 23 de croissance du fibroblaste (FGF23) et la concentration circulante de 1,25(OH)<sub>2</sub>D, selon un mécanisme classique de rétrocontrôle négatif.

Contrairement à la synthèse rénale, la synthèse extrarénale de 1,25(OH)<sub>2</sub>D ne semble pas être régulée par la PTH ou la calcémie.

Le métabolisme de la vitamine D est autorégulé *via* une voie d'inactivation. En effet, le calcitriol induit l'expression de la 24-hydroxylase (CYP24A1) qui convertit la 25(OH)D<sub>3</sub> et la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en métabolites inactifs (24,25 (OH)<sub>2</sub> vitamine D et 1,24,25(OH)<sub>3</sub> vitamine D) transformés ensuite en acide calcitroïque inactif (**Holick, 2007**). D'autres enzymes de la famille des cytochromes P450 comme le CYP3A4 peuvent également dégrader le calcitriol dans le foie et l'intestin (**Landrier, 2014**).

Le calcitriol est responsable des différents effets génomiques et non génomiques de la vitamine D, dont les mécanismes d'action impliquent notamment un récepteur nucléaire spécifique, le vitamin D receptor (VDR) et diverses voies de signalisation contrôlées par un récepteur membranaire, la protéine disulfide. Deux hormones peptidiques, la calcitonine et la parathormone (PTH), participent avec la 1,25-dihydrovitamine D<sub>3</sub> à la régulation de l'homéostasie du calcium et à celle du métabolisme du phosphate (**Trifiletti, 2014**).

#### **IX.4. Action des vitamines sur la fertilité**

Les vitamines ont été associées à la fertilité de l'homme. Elles sont liées à la reproduction, la spermatogenèse, la synthèse et la sécrétion d'androgène (**Abdulkareem et al., 2005**). Elles sont utilisées dans le traitement de certaines infertilités et elles interviennent dans le piégeage des ERO (**Moslemi et Tavanbakhsh, 2011 ; Travers et al., 2013 ; Vijayprasad et al., 2014**).

La vitamine A intervient dans la régulation de la fonction testiculaire et de la fertilité masculine (**Abdulkareem et al., 2005**). Elle participe à la différenciation du tractus génital mâle, de la prostate et des vésicules séminales. Elle induit la production de certaines hormones telles que la testostérone. Au niveau des spermatozoïdes, une carence en vitamine A entraîne une diminution de l'activité des activateurs de l'acrosine et du plasminogène qui sont des enzymes protéolytiques essentielles à l'induction de la réaction acrosomique. La carence en vitamine A est aussi à l'origine du blocage de la spermatogenèse avec un arrêt de la différenciation des spermatogonies (**Abdulkareem et al., 2005**). Par contre, une hypervitaminose A induit des atteintes testiculaires et perturbe la spermatogenèse.

La vitamine D a un rôle indirect sur la fertilité masculine en régulant le taux de calcium dans les tissus reproducteurs particulièrement les testicules (**Blomberg, 2012**). Des récepteurs de la vitamine D ont été identifiés sur les cellules de Sertoli et sur les spermatozoïdes. La vitamine D et ses récepteurs semblent jouer un rôle important au niveau de la survie des spermatozoïdes et de

l'acquisition de leur pouvoir fécondant. Elle intervient dans la synthèse de certaines hormones telles que la testostérone au niveau des testicules (**Blomberg, 2012**). La carence en vitamine D est associée à une diminution massive de la fertilité avec une spermatogenèse incomplète et des anomalies du développement.

La vitamine E encore appelée vitamine anti stérilité est un anti oxydant majeur efficace pour la protection des spermatozoïdes (**Nouri et al., 2008**). De nombreuses études chez l'animal et chez l'homme infertile rapportent un effet bénéfique de la supplémentation en vitamine E sur la qualité du sperme (**Nouri et al., 2008**). Une carence de cette vitamine cause chez le mâle une stérilité incurable par suite d'une atrophie testiculaire et d'une destruction des cellules germinales et de l'épithélium séminifère.

# **MATERIEL ET METHODES**



## **I. MATERIEL**

### **I.1. Site de l'étude**

Cette étude a été réalisée à l'Unité de Biologie de la Reproduction (UBR) du département de Biochimie Clinique et Fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Elle s'est étendue sur la période allant de Janvier 2013 à Décembre 2016.

### **I.2. Matériel biologique**

Il est constitué d'échantillons de spermatozoïdes humains qui ont été recueillis chez des patients de l'IPCI. Le recueil de sperme a été effectué avec l'accord des patients pour l'utilisation de leur prélèvement à des fins de recherche, et l'autorisation de la Commission Nationale d'Ethique et de la Recherche de la Côte d'Ivoire (CNER-CI); ordonnance n ° 36 / MLS / CNER / TB.

Ainsi, parmi les 850 spermatozoïdes humains recueillis, seuls les échantillons du plasma séminal des spermatozoïdes normozoospermiques et azoospermiques ont été sélectionnés pour l'étude de l'identification de nouveaux biomarqueurs. Les échantillons de spermatozoïdes normozoospermiques ont été considérés comme le groupe de contrôle.

#### **I.2.1. Critères d'inclusion**

Les critères de sélection pour le recueil de sperme, ont été les suivants :

- avoir des rapports sexuels réguliers (au moins deux rapports sexuels par semaine)
- observer 3 jours d'abstinence de rapports sexuels avant le prélèvement de sperme.

#### **I.2.2. Critères de non inclusion**

Les critères de non inclusion ont concernés tous les hommes n'ayant pas satisfait les critères d'inclusions ci-dessus définis.

#### **I.2.3. Critères d'exclusion pour l'étude des biomarqueurs**

Pour l'étude des biomarqueurs, les spermatozoïdes retenus ont été uniquement ceux présentant une azoospermie et une normozoospermie après la réalisation du spermogramme. Les spermatozoïdes présentant une leucospermie et une hyperviscosité ont été exclus de cette étude.

### **I.3. Matériel technique et réactifs**

#### **I.3.1. Matériel et réactifs pour la réalisation du spermogramme**

- **Matériel**

Les pipettes graduées de 5 mL et 2 mL ont été utilisées pour la mesure du volume du sperme.

Les pipettes compte-gouttes stériles ont permis de déterminer la viscosité.

Des lames et lamelles (22 × 22 mm) ont été utilisées pour l'évaluation de la vitalité des spermatozoïdes et la réalisation des frottis de sperme.

La cellule de Makler<sup>®</sup> a permis de dénombrer les spermatozoïdes et d'évaluer leur mobilité.

Le papier pH a servi à évaluer le pH du sperme.

L'observation des spermatozoïdes a été faite au microscope optique de marque Magnus MLXi<sup>®</sup>. Il a permis de réaliser les différentes lectures à savoir la numération, la mobilité, la vitalité et le spermocytogramme (**Figure 5**).

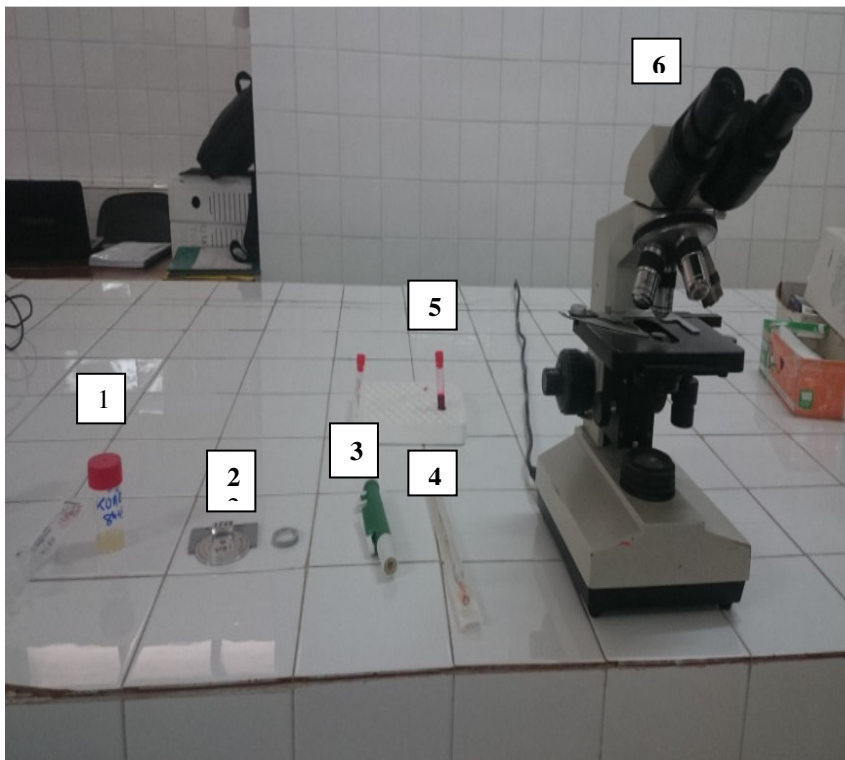
Un automate d'analyse du sperme SQA-VISION<sup>®</sup> a été aussi utilisé pour la réalisation automatique du spermogramme (**Figure 6**). C'est un instrument médical d'analyse hautement performant qui combine la technologie optoélectronique, les algorithmes informatiques et la vidéo microscopique.

- **Réactifs**

L'éosine et la nigrosine sont des colorants qui ont été utilisés pour évaluer la vitalité des spermatozoïdes. La nigrosine a servi de contraste tandis que l'éosine a été utilisée comme étant le colorant différentiel. En effet, l'éosine présente la capacité de pénétrer dans les spermatozoïdes morts du fait de la lésion de leur membrane plasmique et de les colorer en rose.

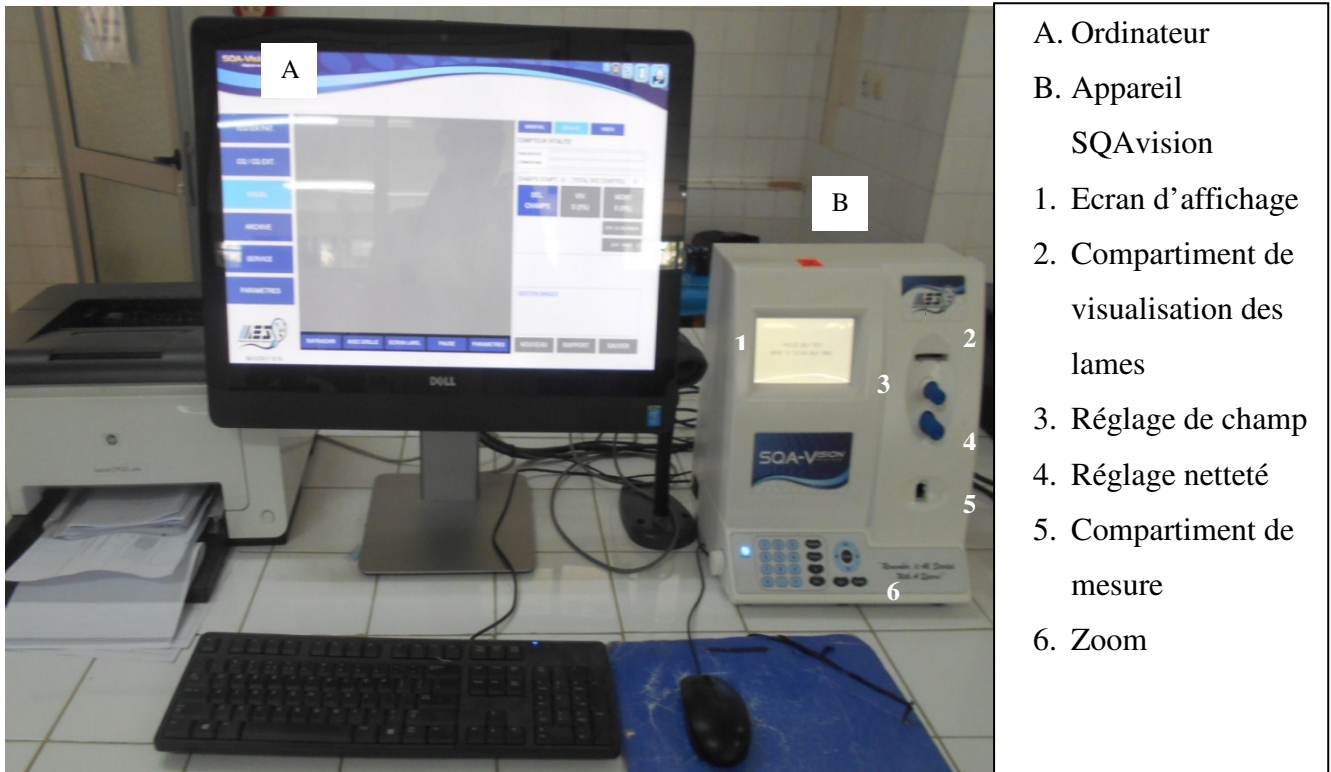
Le kit de coloration rapide SPERMOSCAN RAL<sup>®</sup> a permis la coloration des frottis de sperme. La coloration par ce kit est une variante rapide de la coloration de May-Grünwald Giemsa. En milieu aqueux tamponné, ces réactifs permettent une coloration différentielle des frottis de sperme, et permet l'observation de la morphologie des spermatozoïdes au microscope.

L'eau distillée a été utilisée pour le rinçage des frottis de sperme après la coloration.



1. Pot de prélèvement
2. Cellule de Mackler
3. Propipette
4. Pipette graduée
5. Tube d'éosine
6. Microscope optique

**Figure 5** : Matériel pour la réalisation du spermogramme



**Figure 6** : Automate de spermologie SQA-Vision®

### I.3.2. Matériel et réactifs pour le dosage des éléments minéraux

- **Matériel**

L'automate Cobas<sup>®</sup> c311 de Roche/Hitachi, est un analyseur multiparamétrique sélectif destiné aux analyses de la biochimie classique et d'immunoanalyse en phase homogène (**Figure 7**). Il a été utilisé pour le dosage du fer, du magnésium et du phosphate inorganique.

L'automate d'analyse des électrolytes de marque Roche Diagnostics AVL 9180 Series<sup>®</sup> a été utilisé pour le dosage des ions sodium, potassium, chlorure et calcium (**Figure 8**).

- **Réactifs**

Le réactif utilisé pour le dosage du fer est constitué d'une cassette cobas c-packs Iron contenant les éléments suivants : l'hydrochlorure de guanidine, l'hydroxylamine, la thiourée dans le compartiment R1, l'ascorbate dans le compartiment R2, la Ferrozine et l'acétate dans le compartiment R3.

La cassette cobas c-packs Magnésium contenant les réactifs R1 constitués de Chlorophosphonazo II, acide N-tris(hydroxyméthyle) méthyle-2-aminoéthanesulfonique et les réactifs R2 contenant EDTA et TES a servi pour le dosage du magnésium.

La cassette cobas c-packs Phosphate inorganique a été utilisée pour le dosage du phosphate inorganique. Elle est composée de molybdate d'ammonium et d'acide sulfurique.

Le dosage du calcium a été réalisé à partir de la cassette cobas c-packs Calcium constituée des réactifs suivants :

R1 : Acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique (CAPS), NaOH,

R2 : o-Crésolphtaléine-complexon, 8-hydroxyquinoléine

Pour le dosage des électrolytes par l'automate Roche Diagnostics AVL 9180 Series<sup>®</sup>, les réactifs suivants ont été utilisés : ISE SNApPAK<sup>™</sup>, Cleaning Solution A, Conditioning Solution et le diluent.

ISE SNApPAK<sup>™</sup> contient les solutions standards permettant le calibrage de l'analyseur.

Le Cleaning Solution A, a servi au nettoyage de l'analyseur.

Le Conditioning Solution a été utilisé pour le réglage de l'électrode de sodium et celui du capteur d'échantillon.

Le diluent a servi à la dilution des échantillons afin d'assurer une meilleure mesure.



1. Emplacement des échantillons, 2. Cuvettes de réaction, 3. Sonde d'échantillonnage, 4. Unité ISE, 5. La sonde de réactif multifonctionnelle,
6. Interface utilisateur

**Figure 7** : Automate de biochimie Cobas C311<sup>®</sup>.

(Source : <https://images.dotmed.com/images/listingpics/2296828.jpg> consulté le 26/11/2016).



1. Affichage du panneau commande,
2. Clavier du panneau commande,
3. Sonde pour l'échantillon,
4. Pack ISE

**Figure 8** : Roche Diagnostics AVL 9180 Series<sup>®</sup> Electrolyte Analyzers.

(Source : <http://medused.com/mmSEL/Images/50358-01.jpg> consulté le 24/10/2017).

### **I.3.3. Matériel technique et réactifs pour la détermination de la peroxydation lipidique et l'activité antioxydante totale**

- **Matériel technique**

Il est constitué d'un spectrophotomètre de marque T80 UV VIS<sup>®</sup> (**Figure 9**). C'est un appareil qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée ou sur une région donnée du spectre.

- **Réactifs pour la détermination de la peroxydation lipidique**

Une solution de 1,1,3,3-tétraméthoxypropane (TMP) à 0,01 % a été utilisée pour la préparation de la solution de calibration du malonyldialdéhyde pendant le dosage.

L'acide 2-thiobarbiturique a été utilisé pour détecter des hydroperoxydes lipidiques et l'oxydation des lipides.

L'eau distillée, l'hydroxyde de sodium (NaOH) et l'acide acétique glacial ont aussi été utilisés pour le dosage du MDA.

- **Réactifs pour la détermination de l'activité antioxydante totale (TAC)**

La solution de sulfate de fer ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) à 100  $\mu\text{M}$  a permis de réaliser la courbe d'étalonnage.

Le tampon acétate de sodium à 300 mM (pH 3,6) ; a permis d'éviter les variations du pH de la préparation.

La solution de 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) à 10 mM a été utilisé pour la détermination du Fe(II) et du Fe total.

Une solution de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  à 20 mM a été également nécessaire pour la détermination de la TAC.





1. Ecran LCD,
2. Clavier numerique,
3. Chambre de lecture

**Figure 9** : Spectrophotomètre T80 UV VIS® .

(Source :

[http://www.oasisscientific.com/uploads/3/0/7/1/3071815/s902975211958334\\_p199\\_i1\\_w701.jpeg](http://www.oasisscientific.com/uploads/3/0/7/1/3071815/s902975211958334_p199_i1_w701.jpeg)

consulté le 08/07/2015)

### **I.3.4. Matériel technique et réactifs pour le dosage des vitamines**

- **Matériel**

Pour le dosage des vitamines liposolubles, la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), en anglais high performance liquid chromatography (HPLC) a été utilisée. L'appareil utilisé était de marque WATERS® (USA) (**Figure 10**). Il a permis l'identification, la séparation et le dosage des vitamines dans le plasma séminal.

Une colonne C18 constituée de gels de silice comportant des greffons alkyles, a servi de phase stationnaire. Elle a permis la séparation des solutés. Celle-ci a constituée la phase stationnaire.

Le détecteur utilisé dans cette étude a été un détecteur à UV. Il a servi à mesurer l'absorbance de la solution à analyser.

Une balance électronique de marque Sartorius ENTRIS 224i-1S® dont la précision est de 0,1mg et la portée de 220g, a été utilisée pour la pesée des différents réactifs.

- **Réactifs**

Le dosage de la vitamine A, D et E a nécessité l'utilisation de plusieurs réactifs :

- Un étalon interne, l'acétate de rétinol ; il n'est pas présent dans le plasma séminal mais il présente la même propriété chromatographique que le rétinol.

- L'éthanol a été utilisé comme solvant organique. Il a permis de rompre les structures dans lesquelles les vitamines A, D et E pourraient être intégrées. Il s'agit des membranes, des lipoprotéines, des gouttelettes lipidiques. L'éthanol a permis aussi d'éliminer toute interférence avec de grosses molécules telles que les protéines et les hydrates de carbone et de créer un milieu dans lequel les analytes seront solubles.

- L'hexane a permis d'extraire ces vitamines du plasma séminal.

- Les standards de vitamines A, D et E ont été utilisés pour réaliser la calibration.

- L'azote gazeux a servi à évaporer l'hexane.

- Le méthanol a permis de dissoudre les résidus de vitamines.

Un mélange méthanol / eau, dans les proportions 97 % et 3 %, a constitué la phase mobile.



1. Réservoir de Solvants
2. Pompe
3. Colonne
4. Injecteur automatique
5. détecteur UV
6. système d'intégration

**Figure 10** : Chaîne de Chromatographie en phase liquide de marque WATERS®

## **II. METHODES**

### **II.1. Réalisation du spermogramme**

Il est réalisé conformément aux normes de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2010).

Le prélèvement de sperme a été effectué par masturbation après trois jours d'abstinence obligatoire de rapports sexuels.

Après la collecte, les échantillons de sperme ont été liquéfiés à la température de 37<sup>0</sup>C à l'étuve pendant une heure, puis utilisés pour l'analyse.

L'examen macroscopique du sperme a permis de déterminer la couleur, le volume, le pH et la viscosité des échantillons.

La couleur de l'éjaculat a été appréciée à l'œil nu.

A l'aide d'une pipette graduée et stérile, le volume du prélèvement a été déterminé. Quant à la viscosité du sperme, elle a été évaluée en laissant écouler le sperme goutte à goutte à l'aide d'une pipette compte gouttes.

Une goutte de sperme a été déposée sur du papier pH pour déterminer le pH.

La numération, la mobilité, la vitalité et le pourcentage de spermatozoïdes de morphologie normale ont été évalués à l'examen microscopique à l'aide d'un microscope optique et de l'automate SQA-Vision.

La numération des spermatozoïdes a été réalisée à l'aide de la cellule de Mackler. Une goutte de sperme a été déposée sur la cellule de Mackler et recouverte de son couvercle. La lecture à l'objectif X 25 au microscope optique a permis de dénombrer les spermatozoïdes.

La mobilité des spermatozoïdes a été évaluée à l'aide de la cellule de Mackler et l'observation a été réalisée à l'objectif X 25. Les spermatozoïdes ont présenté trois types de mobilité qui sont : fléchante, progressive et immobile. La mobilité a aussi été évaluée à l'aide de l'automate SQA-Vision.

Pour évaluer la vitalité, une goutte de sperme et une goutte d'éosine ont été placées entre lame et lamelle, puis la préparation a été observée grâce à l'automate SQA-Vision. Les spermatozoïdes morts étaient colorés en rose tandis que ceux vivants apparaissaient en blanc.

Après la réalisation du frottis de sperme, les lames ont été colorées à l'aide du kit de colorants RAL 555. La lecture de la morphologie a été faite sous huile à immersion à l'objectif X 100. Les spermatozoïdes ont été évalués à partir des critères de Krüger qui a permis de définir le pourcentage de spermatozoïdes de formes normales.

### **II.2. Conservation du plasma séminal**

Les prélèvements de spermes ont été centrifugés à 3000 tours / min pendant 10 min puis le plasma séminal a été recueilli et conservé à - 8<sup>o</sup> C pendant une année.

## II.3. Dosage des éléments minéraux

### II.3.1. Méthodes générales de dosage

Le dosage du chlore, du sodium et du potassium a été réalisé à partir de la méthode de l'électrode ion-sélective, en utilisant l'analyseur Roche Diagnostics AVL 9180 Series<sup>®</sup> Electrolyte Analyzers. L'électrolyte Analyser présente six différentes électrodes qui sont spécifiques du sodium, du potassium, du chlore, du calcium ionisé, du lithium et une de référence. Chaque électrode présente une spécificité vis-à-vis de l'élément minéral à quantifier dans l'échantillon à analyser. Lorsque l'électrode spécifique est immergée dans l'échantillon, sa membrane développe un potentiel dû à une réaction sélective et spontanée. L'électrode de référence a permis de fournir un potentiel constant qui a servi à mesurer les variations dues à l'électrode indicatrice.

Le dosage du calcium, du phosphate inorganique, du magnésium et du fer a été réalisé à partir du Cobas c311 dont le principe de fonctionnement est basé sur la spectrophotométrie. La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert selon la formule suivante :

$$C = \frac{DO}{\epsilon d}$$

DO = Densité optique

C = Concentration du substrat ou du produit

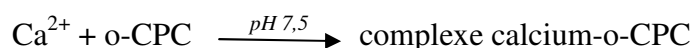
$\epsilon$  = Coefficient d'extinction moléculaire

d = trajet de la lumière

### II.3.2. Méthodes de dosage spécifique

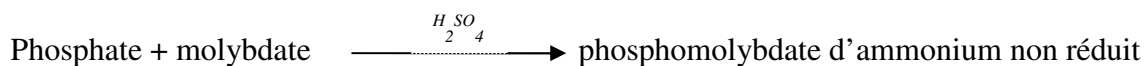
Le dosage du chlore, du sodium et du potassium a été réalisé après une dilution au 1/5<sup>ème</sup> du plasma séminal.

- Le dosage des ions calcium s'est fait selon la méthode de Schwarzenbach avec l'o-crésolphtaléine-complexon (**Ferguson et al., 1962**). Les ions calcium réagissent avec l'o-crésolphtaléine-complexon (o-CPC) dans des conditions alcalines pour former un complexe coloré violet. L'addition de 8-hydroxyquinoléine évite toute interférence du magnésium et du fer.



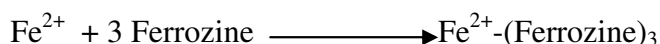
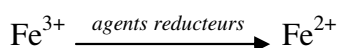
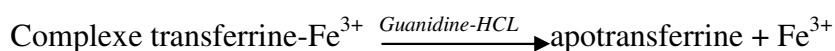
L'intensité de la coloration du complexe formé, est directement proportionnelle à la concentration du calcium qui est mesurable au spectrophotomètre à 552 nm.

- La méthode utilisée pour le dosage du phosphate inorganique est celle du phosphomolybdate directe décrite par **Daly et Ertingshausen (1972)**. Le phosphate inorganique réagit avec le molybdate d'ammonium en solution dans l'acide sulfurique pour former du phosphomolybdate non réduit.



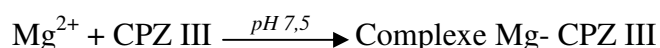
La concentration en phosphomolybdate formé est directement proportionnelle à la concentration en phosphate inorganique. Elle se mesure à la longueur d'onde de 340 nm.

- Le dosage du Fer a été réalisé à partir de la méthode Guanidine/Ferrozine (**Stookey, 1970**). Les ions  $\text{Fe}^{3+}$  sont détachés de la transferrine par l'hydrochlorure de guanidine et réduits en ions  $\text{Fe}^{2+}$  par l'ascorbate et l'hydroxylamine. Le fer divalent forme un complexe chélate coloré en rouge avec la Ferrozine. Afin d'éviter l'interférence du cuivre, les ions cuivriques sont liés à la thiourée.



L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration de fer et on la mesure à 552 nm.

- La méthode colorimétrique utilisant le chlorophosphonazo III a été exploitée pour le dosage du magnésium (**Ferguson et al., 1962**). Le chlorophosphonazo III (CPZ III) se lie au magnésium et entraîne un pic d'absorbance à 659 nm. L'acide éthylène-bis(oxyéthylènenitrilo)tétracétique (EGTA) sert à inhiber la fixation du calcium sur le CPZ III.



Les interférences d'absorbance non spécifique sont réduite par l'EDTA qui élimine le magnésium du complexe magnésium-CPZ III et permet de doser le calibrateur zéro avec exactitude.



La différence d'absorbance entre le complexe magnésium-CPZ III et le complexe traité par EDTA correspond à l'absorbance due au magnésium seul.

#### II.4. Détermination de la peroxydation lipidique par le dosage des TBARS

La détermination des substances réagissant avec l'acide thio-barbiturique, en anglais Thio Barbituric Acid reactive Substances (TBARS) a été réalisée par la mesure du malonyldialdéhyde selon la méthode décrite par **Rao et al. (1989)**. Le malonyldialdéhyde est l'un des marqueurs de la peroxydation lipidique.

Les échantillons de plasma séminal ont été décongelés à la température ambiante, puis 100 µL de ceux-ci ont été dilués avec 900 µL d'eau distillée. Cette dilution a été immédiatement utilisée pour le dosage du MDA et de la TAC.

La solution d'étalonnage a été préparée à partir d'une solution de 1,1,3,3-tétraméthoxypropane (TMP) à 0,01 %. La gamme d'étalonnage a été réalisée en procédant à des dilutions au demi (½). Celle-ci a permis de tracer la droite d'étalonnage présentée à la **Figure i en annexe**.

A 1 mL de plasma séminal dilué, a été ajouté 500 µL de réactif d'acide thiobarbiturique (0,67 g d'acide 2-thiobarbiturique dissous dans 100 mL d'eau distillée avec du NaOH à 0,5 g et 100 mL d'acide acétique glacial) ; l'ensemble a été chauffé pendant 1 heure au bain-marie à 100°C. Après refroidissement à la température ambiante, chaque tube est centrifugé pendant 10 minutes à 4000 tours / min, et l'absorbance du surnageant est lue au spectrophotomètre à 534 nm.

#### II.5. Détermination de l'activité antioxydante totale (TAC)

Le test du pouvoir antioxydant de réduction ferrique, en anglais Ferric Reducing Antioxydant Power (FRAP) décrit par **Benzie et Strain (1996)** comme une méthode permettant de déterminer l'activité antioxydante totale des fluides biologiques, a été utilisée dans cette étude.

La gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution mère de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O à 100 µM. Celle-ci a permis de réaliser la droite d'étalonnage présentée par la **Figure ii en annexe**. Le réactif de FRAP a été préparé en mélangeant dans les proportions 10/1/1 (v/v/v) une solution de tampon acétate de sodium à 300 mM (pH 3,6), une solution de TPTZ à 10 mM et une solution de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O à 20 mM.

Ainsi, 1,5 mL de cette préparation a été mis dans un tube à hémolyse en verre pour chaque échantillon puis maintenu à 37°C au bain marie pendant 5 minutes. Ensuite 50 µL du plasma séminal dilué est ajouté au réactif de FRAP précédemment préparé. Le mélange a été remis au bain marie à 37° C pendant 10 min. L'absorbance de la préparation est lue à 593 nm au spectrophotomètre.

## **II.6. Méthodes de dosage des vitamines A, E et D**

Le dosage simultané des vitamines A, E et D a été réalisé à partir du protocole établi par **Bahi (2017)**. Ce dosage a nécessité plusieurs étapes qui sont :

- la préparation d'une gamme de dilution des solutions de standards des vitamines A, E et D,
- la calibration de la chaîne CLHP,
- l'extraction des vitamines du plasma séminal,
- le dosage proprement dit.

### **II.6.1. Préparation des solutions-mères standards**

Les solutions mères des standards des vitamines A et D, ont été préparées à 10 mg/L après une dilution dans du méthanol. Celle de la vitamine E a été préparée à 20 mg/L. Quant au standard interne ; le rétinyl acetate, il a été préparé à 1 mg/L.

### **II.6.2. Calibration**

Pour la calibration, plusieurs dilutions successives de moitié des solutions des différents standards ont été réalisées pour constituer des gammes de dilution. Ainsi, les gammes de dilution pour le rétinol et le cholécalciférol ont été de 1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 et 0,0625 mg/L. Celles de l'  $\alpha$ -tocophérol ont été de 20 ; 10 ; 5 ; 2,5 ; 1,25 et 0,625 mg/L. Ces différentes dilutions ont été injectées dans le CLHP à répétition afin d'obtenir une meilleure calibration. Les différentes concentrations obtenues ont permis de tracer les droites d'étalonnage qui sont présentées aux **figures iii, iv et v en annexe**.

### **II.6.3. Extraction des vitamines A, D et E**

L'extraction des vitamines liposolubles A, D et E a été réalisée selon le procédé d'extraction liquide-liquide à froid.

A 500  $\mu$ L d'acetate de rétinol, est ajouté 500  $\mu$ L de plasma séminal. Le mélange a été agité pendant 10 min, puis 1000  $\mu$ L d'éthanol froid a été additionnés. L'ensemble est homogénéisé pendant 60 secondes par l'agitateur. Ensuite, 2,5 mL d'hexane froid ont été ajoutés à la préparation qui est ensuite homogénéisée pendant 5 min. La préparation est centrifugée à 3500 g pendant 15 min à 4<sup>0</sup>C. La couche supérieure hexanique a été prélevée et évaporée sous flux d'azote, puis 500  $\mu$ L de méthanol froid a été ajouté au culot et l'ensemble a été agité pendant 10 secondes.

### **II.6.4. Critères chromatographiques**

Les expériences ont été réalisées en mode isocratique. La phase mobile a été composée d'un mélange méthanol / eau dans les proportions 97 % et 3 %. Le débit a été maintenu à 1 mL/min et la



spectrophotométrie de détection à 280 nm. Le temps d'éluion a été de 10 min. Le volume de l'extrait injecté dans le CLHP a été de 20 µL.

### II.6.5. Détermination de la concentration des vitamines A, D et E dans le plasma séminal

Pour le calcul des concentrations des vitamines A, D et E, un facteur de correction K est réalisé en introduisant un étalon interne. Ainsi la formule de calcul des différentes concentrations est la suivante :

$$C = \frac{SR \text{ Ech}}{SRA \text{ Ech}} \times K \qquad K = \frac{CR \text{ GE} \times SRA \text{ GE}}{SR \text{ GE}}$$

SR Ech : surface du pic de la vitamine dans l'échantillon de plasma séminal

CR GE : concentration de la vitamine déterminée à partir de la gamme d'étalonnage

SRA GE : surface du pic du retinyl acetate correspondant à 1mg/L obtenue à partir de la gamme d'étalonnage.

SR GE : surface du pic correspondant à la concentration choisie de la vitamine à partir de la gamme d'étalonnage

SRA Ech : surface du pic du retinyl acetate dans l'échantillon du plasma séminal correspondant à une concentration de 1 mg/L.

### II.7. Analyse statistique

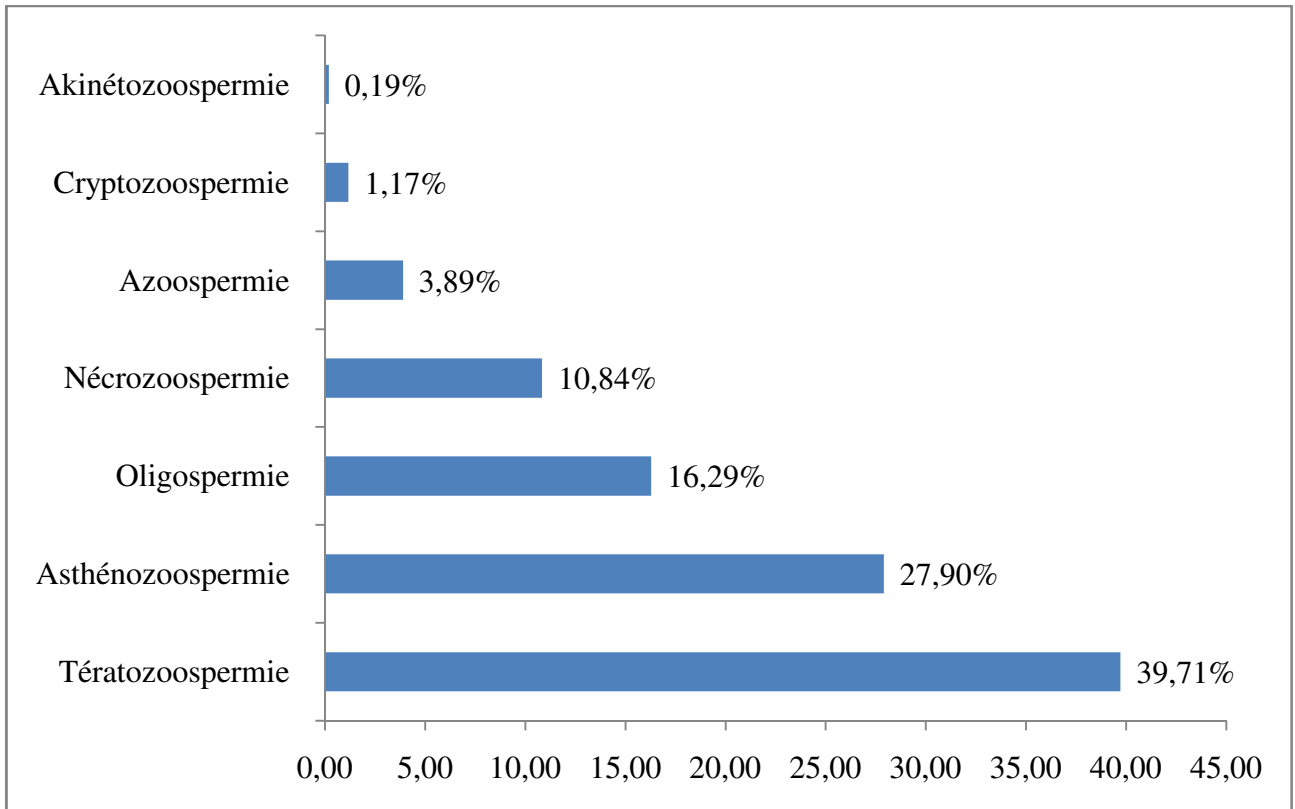
Le logiciel GraphPad Prism 5.0 et Excel ont permis de réaliser les analyses statistiques. Les résultats ont été rapportés en moyenne ± écart type. Les comparaisons entre le plasma séminal des azoospermes et des normozoospermes ont été effectuées à partir des tests t de Student et de Mann-Whitney pour échantillons indépendants non appariés.

Un intervalle de confiance de 95 % a été utilisé. Une valeur  $p < 0,05$  est considérée comme statistiquement significative.

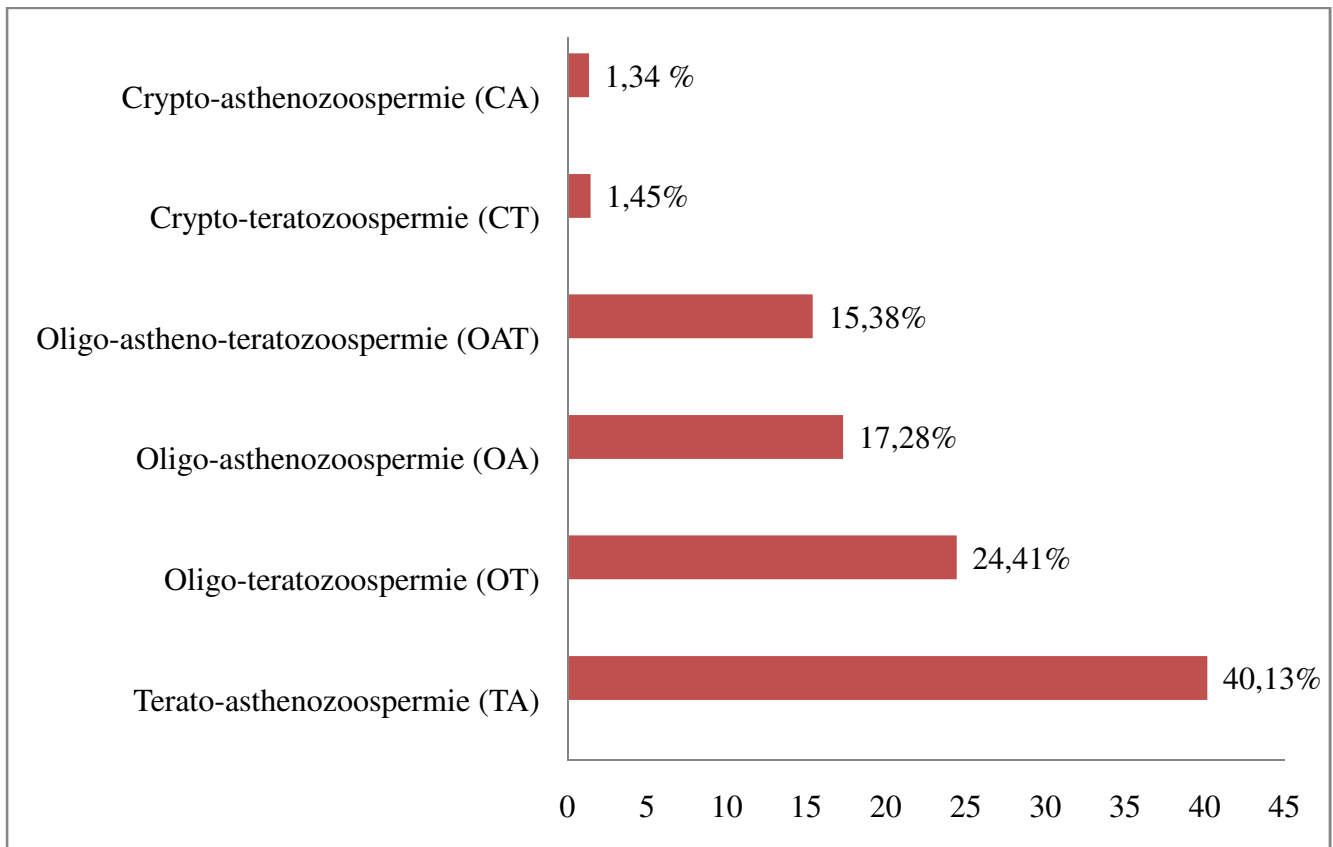
# **RESULTATS ET DISCUSSION**

## I. PROFIL SPERMIOLOGIQUE DES HOMMES REÇUS A L'IPCI

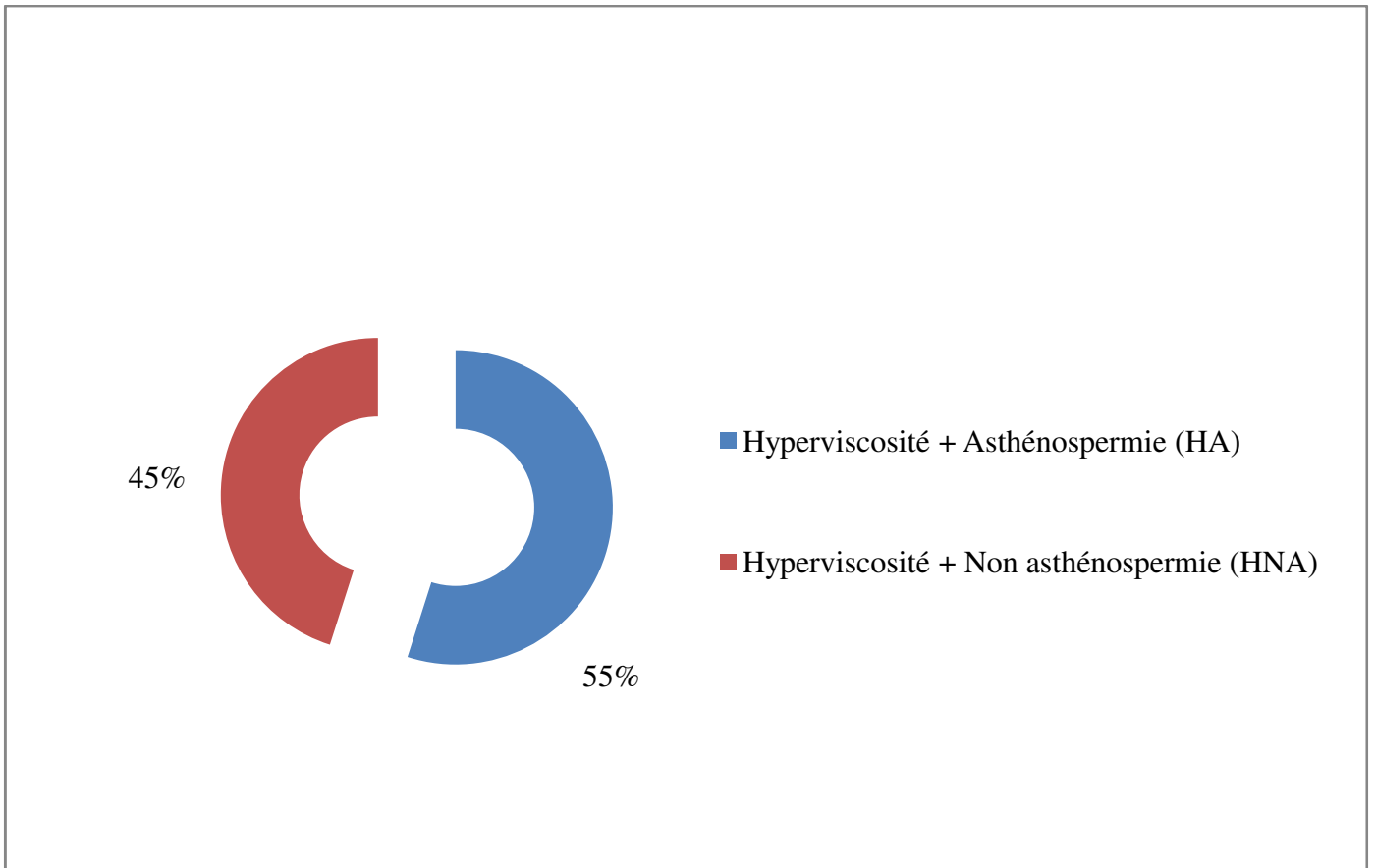
Cette étude a permis d'analyser 850 échantillons de sperme. Parmi ceux-ci, 2 % des sujets ont présentés un spermogramme normal tandis que 98 % ont eu un spermogramme indiquant une anomalie. La répartition des différentes anomalies du spermogramme a montré un taux élevé de tératozoospermie soit 39,71 %, suivi de l'asthénozoospermie 27,90 % et de l'oligozoospermie 16,29 % (**Figure 11**). Cette répartition a indiqué que l'anomalie la plus rare du spermogramme a été l'akinétozoospermie avec 0,20 %. Cette étude a aussi permis de mettre en évidence des anomalies associées du sperme (**Figure 12**). Le rapport entre l'hyperviscosité et la mobilité des spermatozoïdes montre que 54,95 % des spermés hypervisquieux analysés ont présenté une asthénozoospermie contre 45,05 % à mobilité normale (**Figure 13**). Cependant, les observations macroscopiques concernant le volume et le pH des spermés prélevés ont montré que 100 % des cas d'hypospermie étaient associés à un pH alcalin (**Figure 14**).



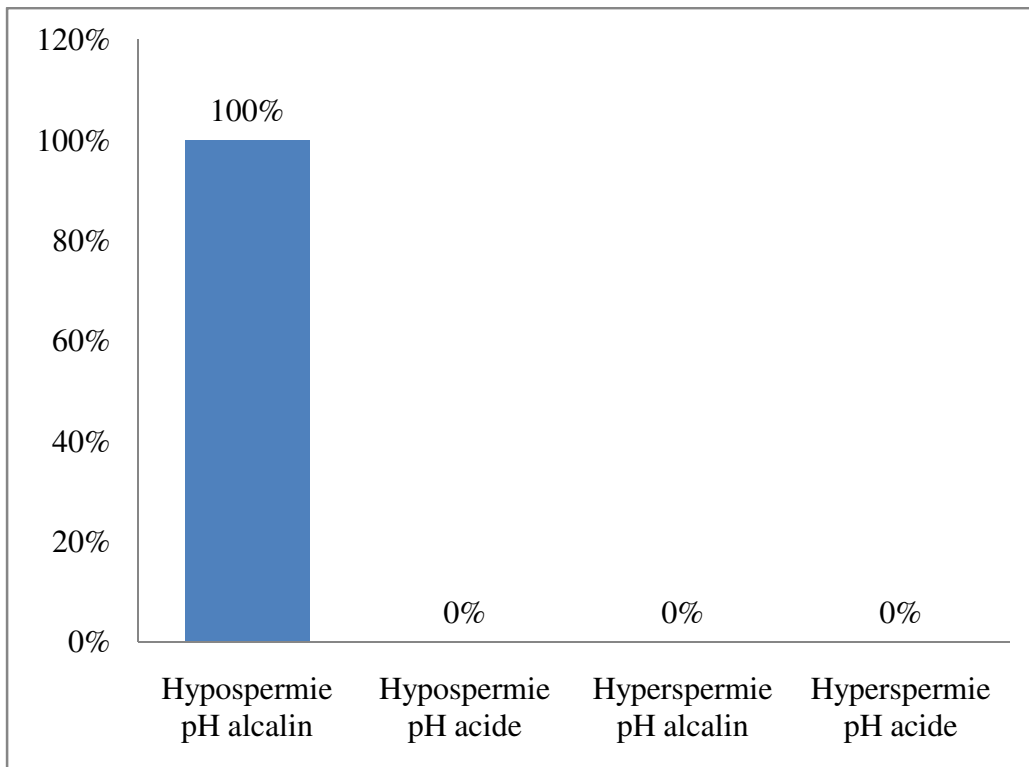
**Figure 11** : Répartition des différentes anomalies du spermogramme.



**Figure 12 :** Répartition des anomalies associées du spermogramme.



**Figure 13 :** Répartition de l'hyperviscosité associée ou non à l'asthénospermie.



**Figure 14 :** Représentation de la relation entre le volume et le pH du sperme.

La réalisation du spermogramme permet de distinguer deux parties qui sont l'analyse macroscopique et microscopique du sperme. En général, ce sont les caractères microscopiques comprenant la numération, la mobilité, la forme des spermatozoïdes qui sont importants pour le diagnostic de l'infertilité masculine dans les consultations des praticiens.

Les résultats de la présente étude permettent d'établir le taux de normozoospermie qui est de 2%. Ce faible taux s'explique par le fait que les hommes sélectionnés pour notre étude ont été incités à faire le spermogramme généralement après une consultation médicale du couple pour un désir de paternité. Ces résultats obtenus sont faibles par rapport aux données obtenues par **Niang et al. (2009)** au Sénégal. En effet le taux de normospermie au Sénégal était de 16 %. La prévalence importante de l'infertilité à l'IPCI, s'explique par le fait qu'il existe très peu de laboratoire expérimenté dans la réalisation du spermogramme en Côte d'Ivoire. **Thonneau et al. (1991)** ont déduit à la suite de leur étude que la contribution masculine à l'infertilité du couple est de 30 à 40 %. Cela entraîne des bouleversements dans les conceptions traditionnelles africaines où la femme est généralement indexée comme étant à l'origine de l'infertilité du couple. Il est important de relever que l'infertilité masculine est généralement due aux infections sexuellement transmissibles (IST) dans 98 % des cas. Les principaux germes responsables de l'infertilité masculine sont les mycoplasmes, *Ureaplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* (**Ouégnin et al., 2008 ; Niang et al., 2009**).

Les proportions des différentes anomalies du spermogramme identifiées au cours de notre étude, ont montré que la tératozoospermie est la pathologie du sperme la plus représentée avec un taux de 39,71 %. Par contre, l'étude de Thonneau a donné un taux de 10 % (**Thonneau et al., 1991**) pour la tératozoospermie. Cette anomalie correspond à un taux de malformations des spermatozoïdes supérieur à 4 % selon la classification de Krüger (**OMS, 2010**). Les causes de celle-ci sont multiples. Elles peuvent être d'ordre génétique ou lié au tabagisme (**Sepaniak et al., 2005 ; Guichaoua et al., 2009**).

L'asthénozoospermie avec un taux de 27,60 % représente la seconde anomalie mise en évidence dans cette étude. Par contre, les travaux de **Follingan et al. (2011)** au Burkina Faso, ont donné un taux de 40,4 % qui est nettement supérieur au taux obtenu dans notre étude. Aussi pour avoir un taux assez représentatif de la population ivoirienne, il serait indispensable de mener d'autres investigations avec une exploration plus large de la population à examiner. L'asthénozoospermie est caractérisée par une baisse voire une absence totale de mobilité des spermatozoïdes éjaculés. C'est une cause fréquente de l'infertilité masculine. La mobilité des spermatozoïdes est acquise au cours du transit épидidymaire. Le mouvement spermatique est important pour les processus impliqués dans la fécondation. Il est indispensable notamment, pour la migration des spermatozoïdes du vagin vers les trompes de Fallope, pour la pénétration de ces derniers dans le cumulus oophorus. Ainsi, il



existe une association entre la mobilité spermatique et les chances de concevoir naturellement (**Beauchamp et al., 1984**).

L'oligozoospermie avec un taux de 16,29 % est la troisième anomalie du sperme la plus représentée. Elle se caractérise par une quantité de spermatozoïdes inférieure à 15 millions / ml selon les normes de l'OMS (2010). L'oligozoospermie est rarement isolée. Elle est souvent associée à une asthénozoospermie et / ou à une tératozoospermie. Elle peut avoir plusieurs étiologies : une origine testiculaire sécrétoire ou excrétoire caractérisée par une obstruction unilatérale sur le tractus, une éjaculation qui peut être incomplète ou rétrograde, une infection ou une inflammation du tractus, la présence d'auto-anticorps dans le plasma séminal ou sur la membrane plasmique des spermatozoïdes, un varicocèle.

La quatrième anomalie est représentée par la nécrozoospermie avec un pourcentage de 10,84 %. Elle correspond au pourcentage de spermatozoïdes vivants dans l'éjaculat qui est inférieur à 58 % selon les normes de l'OMS (2010). Ces différentes étiologies peuvent être regroupées en 3 catégories :

- Testiculaire : hyperthyroïdie, varicocèle, hyperthermie locale, la consommation de cannabis et de produits toxiques ;
- Post-testiculaire : nécrozoospermie, épидидymaire, anomalie du plasma séminal, polykystose rénale, post vasovasostomie et anticorps antispermatozoïdes ;
- Mixte : infections, tabac, toxiques, blessé médullaire, âge, obésité (**Dumont et al., 2017**).

Enfin, la cinquième et la sixième anomalie sont représentées respectivement par l'azoospermie avec un taux de 3,89 % et la cryptozoospermie (1,17 %). Selon les normes de l'OMS, la cryptozoospermie est caractérisée par une numération des spermatozoïdes inférieurs à 100 000. L'azoospermie touche moins de 1 % des hommes dans la population générale, soit 5 à 15 % des hommes infertiles. Les azoospermies sont de deux types : sécrétoires avec une spermatogenèse altérée ou nulle, excrétoires avec une spermatogenèse normale mais des voies séminales obstruées ou altérées dès l'embryogenèse. L'association de ces deux types d'azoospermie est possible est appelée azoospermie mixte (**Coat et al., 2011**). Le taux d'azoospermie déterminée dans notre étude est relativement faible comparativement à celui du Mali qui est de 23,7 % (**Traoré et al., 2008**).

L'anomalie la moins représentée est l'akinétozoospermie qui est l'immobilité totale des spermatozoïdes vivants avec 0,2 %. Les associations de trois anomalies du sperme sont très remarquables avec l'oligo-asthénotératozoospermie (OAT) dont le taux est de 15,38 %. L'étude de **Thonneau et al. (1991)** a donné un taux de 21 % pour l'OAT tandis que l'étude réalisée au Burkina Faso donne un taux de 7,2 % (**Follingan et al., 2011**).

L'hyperviscosité a une influence notable sur la numération et la mobilité des spermatozoïdes (**Esfandiari et al., 2014**). Elle influence la qualité des résultats du spermogramme. Pour **Esfandiari**

*et al.* (2014), les spermatozoïdes à viscosité élevée montrent une adhérence homogène, et leur consistance reste inchangée avec le temps. Par contre notre étude a montré que les spermatozoïdes hyperviscueux analysés présentaient un temps de liquéfaction assez long. Aussi, il a été observé une amélioration de la mobilité des spermatozoïdes au cours du temps. Ces spermatozoïdes ont été alors considérés comme hyperviscueux. En effet, les normes de l'OMS indiquent que le sperme normal se liquéfie 30 à 60 minutes après l'éjaculation (OMS, 2010). Ces normes servent de références pour l'interprétation des résultats du spermogramme.

En outre, notre étude a permis de constater que l'hypospermie est fortement corrélée à l'alcalinité des prélèvements, montrant une probable insuffisance de l'activité prostatique.

## II. EVALUATION DES BIOMARQUEURS DU PLASMA SEMINAL

L'étude de l'identification de nouveaux biomarqueurs de l'azoospermie dans le plasma séminal a inclus 30 normospermes et 30 azoospermes à partir des critères de l'OMS. L'âge moyen du groupe des azoospermes a été de 39 ans (intervalle : 23-45ans). Tandis que le groupe des témoins a eu une moyenne d'âge de 39 ans avec un intervalle compris entre 26 et 45 ans. Les différences entre les groupes n'ont pas été statistiquement significatives.

Les spermogrammes des normospermes et des azoospermes ont donné des valeurs moyennes normales pour les caractères macroscopiques c'est-à-dire le volume et le pH. Tandis que pour les caractères microscopiques, les azoospermes étaient caractérisés par l'absence de spermatozoïdes dans le plasma séminal. Ainsi, nous avons obtenus pour les normospermes :

- un volume moyen de  $3,42 \pm 0,24$  mL,
- un pH de 7,58,
- une numération des spermatozoïdes moyenne de  $68,88 \pm 6,74$  millions / mL,
- une mobilité progressive à une heure de 47,20 %,
- une mobilité progressive à la quatrième heure de 31,20 %,
- le pourcentage de formes normales était de 23,52 %,

Les données relatives au spermogramme du groupe des azoospermes sont caractérisées par :

- une absence de spermatozoïdes,
- un volume moyen de  $2,96 \pm 0,25$  mL,
- un pH de  $7,61 \pm 0,04$  (**Tableau I**)

**Tableau I :** Caractéristiques du spermogramme des normospermes et des azoospermes.

	<b>Normospermes</b>	<b>Azoospermes</b>
<b>Nombre d'échantillons</b>	30	30
<b>Volume (ml)</b>	3,42±0.24	2,96±0.25
<b>pH</b>	7,58±0.05	7,61±0.04
<b>Concentration (10<sup>6</sup>/ml)</b>	68,88±6.74	00
<b>Mobilité à 1H (a+b) (%)</b>	47,20±1.53	x
<b>Mobilité à 4H (a+b) (%)</b>	31,20±1.48	x
<b>Formes normales (%)</b>	23,52±1.82	x

**x : Absence de spermatozoïdes**

## II.1. Evaluation des éléments minéraux dans le plasma séminal

L'évaluation des éléments minéraux dans le plasma séminal des azoospermes et des normospermes a permis d'obtenir les valeurs moyennes de la concentration en ion  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$  et  $\text{Fe}^{2+}$  pour ces deux catégories de spermes. La  $p$ -value pour les différents éléments minéraux analysés a donné une valeur supérieure au seuil de 0,05 fixé. Ainsi, la différence de concentration en éléments minéraux du plasma séminal des azoospermes et des normospermes n'a pas été significative. La concentration en éléments minéraux du plasma séminal ne peut alors servir de marqueur biochimique de différenciation entre les normospermes et les azoospermes.

Chez les normospermes, la concentration moyenne en sodium du plasma séminal a été de  $192,8 \pm 28,20$  mg/L. Elle est supérieure à celle des azoospermes qui a été de  $189,0 \pm 11,66$  mg/L (**Figure 15**). Mais la  $p$ -value a été de 0,627. Aussi la différence entre ces moyennes n'est pas significative.

Pour le potassium, la concentration moyenne du plasma séminal des normospermes a été de  $26,63 \pm 8,18$  mg/L contre  $28,41 \pm 7,33$  mg/L chez les azoospermes. La concentration en potassium a été légèrement supérieure à celle des normospermes (**Figure 16**). Mais la différence de concentration en potassium entre ces deux catégories de sperme n'a pas été significative avec une  $p$ -value de 0,609.

La concentration moyenne en chlorure du plasma séminal des normospermes a été de  $138,3 \pm 9,70$  mg/L tandis que celle des azoospermes a été de  $130,8 \pm 13,74$  mg/L (**Figure 17**). Aussi la différence entre ces deux moyennes n'a pas été significative. En effet, la  $p$ -value a été de 0,136.

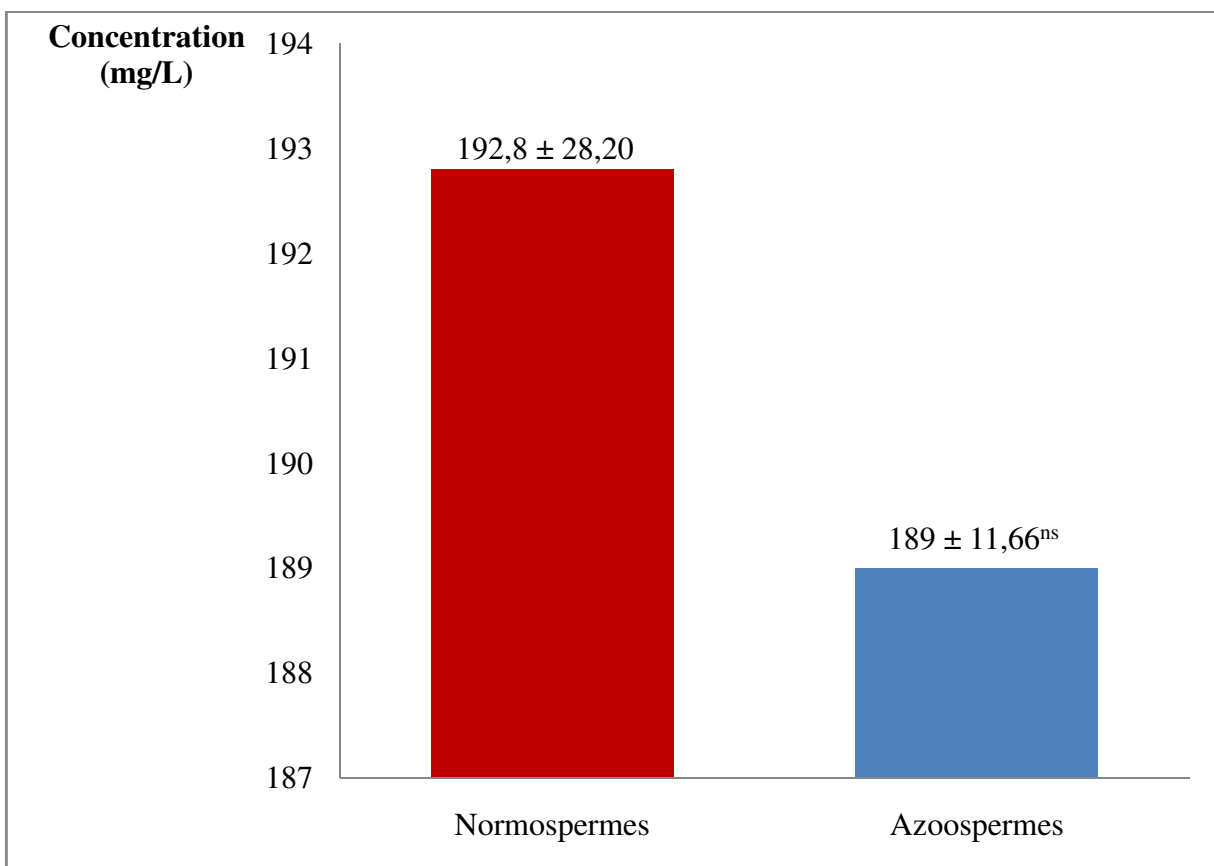
La concentration moyenne en calcium des normospermes a été de  $194,8 \pm 77,21$  mg/L contre  $213,2 \pm 49,23$  mg/L chez les azoospermes (**Figure 18**). La concentration en calcium des azoospermes a été supérieure à celle des normospermes mais n'a pas présenté de différence significative. Car la  $p$ -value a été de 0,588.

La concentration en phosphate inorganique a été de  $439,1 \pm 58,38$  mg/L chez les normospermes et  $417,1 \pm 67,71$  mg/L chez les azoospermes (**Figure 19**). La différence de concentration en phosphate inorganique entre ces deux catégories de plasma séminal, n'a pas été significative. La  $p$ -value a été de 0,353.

Le magnésium a présenté une concentration moyenne de  $35,90 \pm 19,22$  mg/L chez les normospermes tandis que chez les azoospermes, elle a été de  $44,27 \pm 19,34$  mg/L (**Figure 20**). La concentration en magnésium a été élevée chez les azoospermes. Mais la différence entre ces deux catégories de plasma séminal n'a pas été significative. La  $p$ -value a été de 0,210.

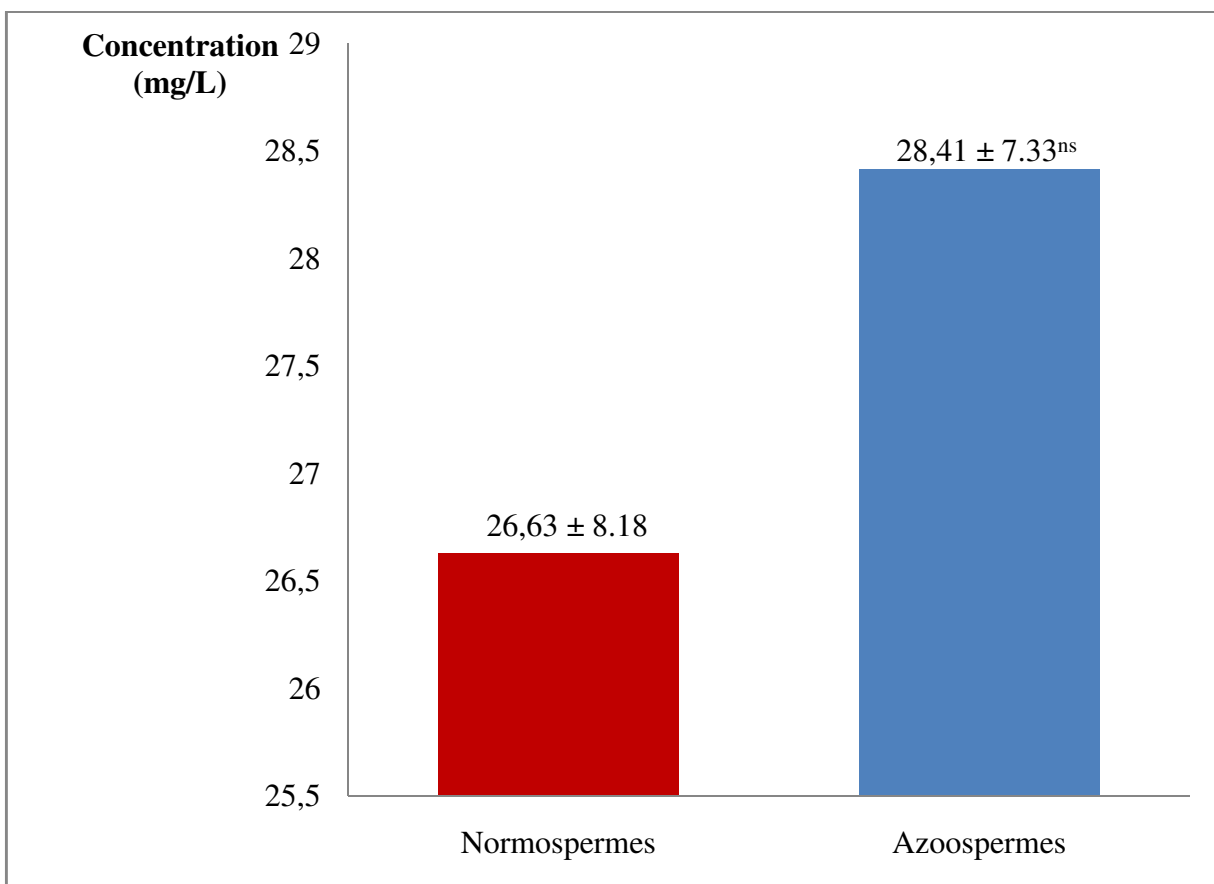
Enfin la concentration moyenne en fer du plasma séminal des normospermes a été de  $5,66 \pm 3,40$  mg/L contre  $5,397 \pm 2,47$  mg/L chez les azoospermes (**Figure 21**). La différence de

concentration entre ces deux catégories de sperme n'a pas été significative. La  $p$ -value a été de 0,877.



ns : non significatif ;  $p > 0,05$

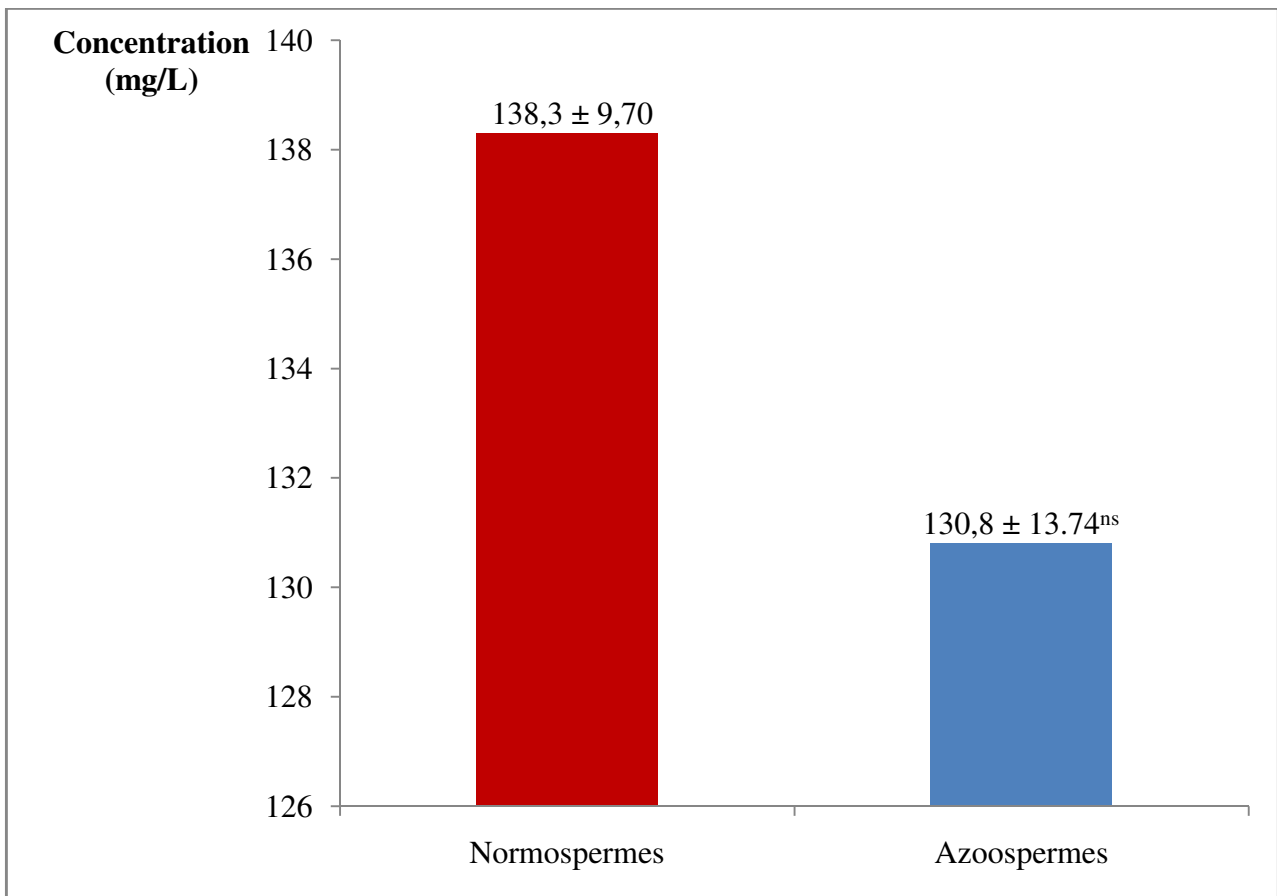
**Figure 15** : Concentration en sodium des normospermes et des azoospermes



ns: non significatif ;  $p > 0,05$

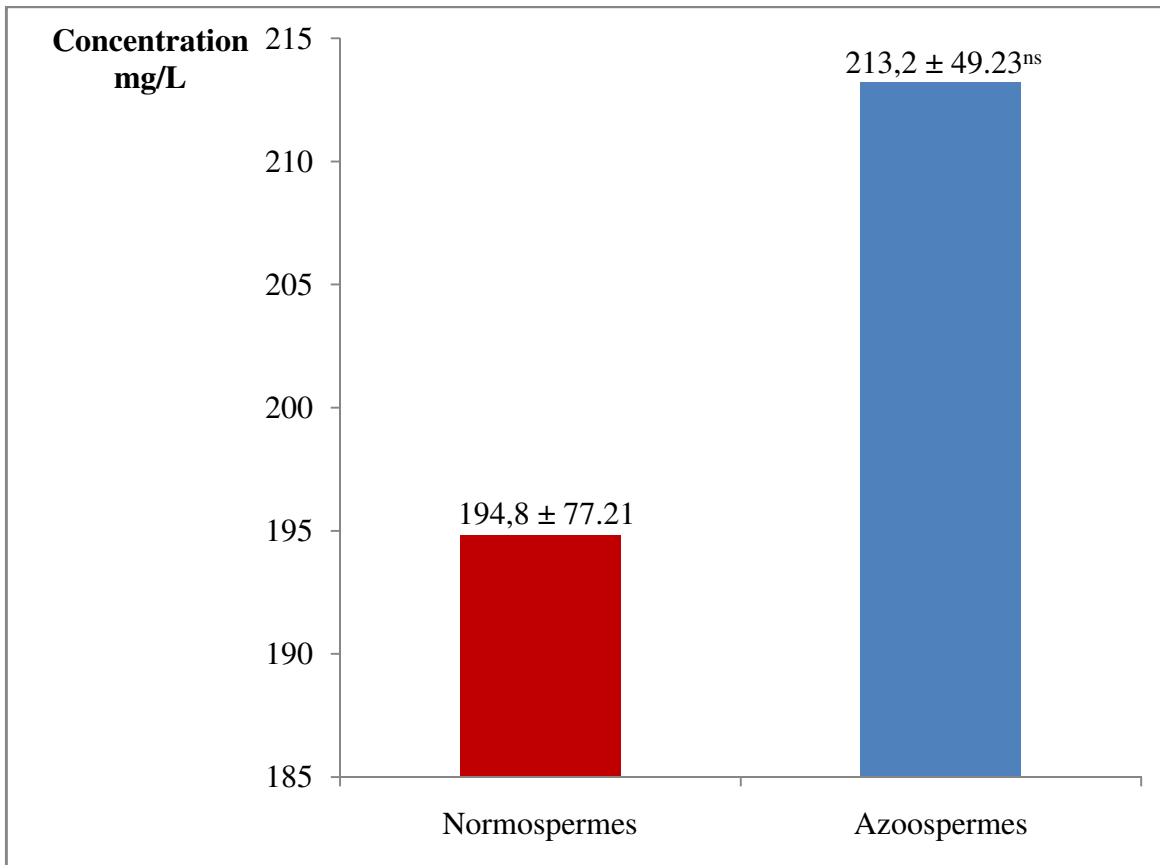
**Figure 26 :** Concentration en potassium des normospermes et des azoospermes





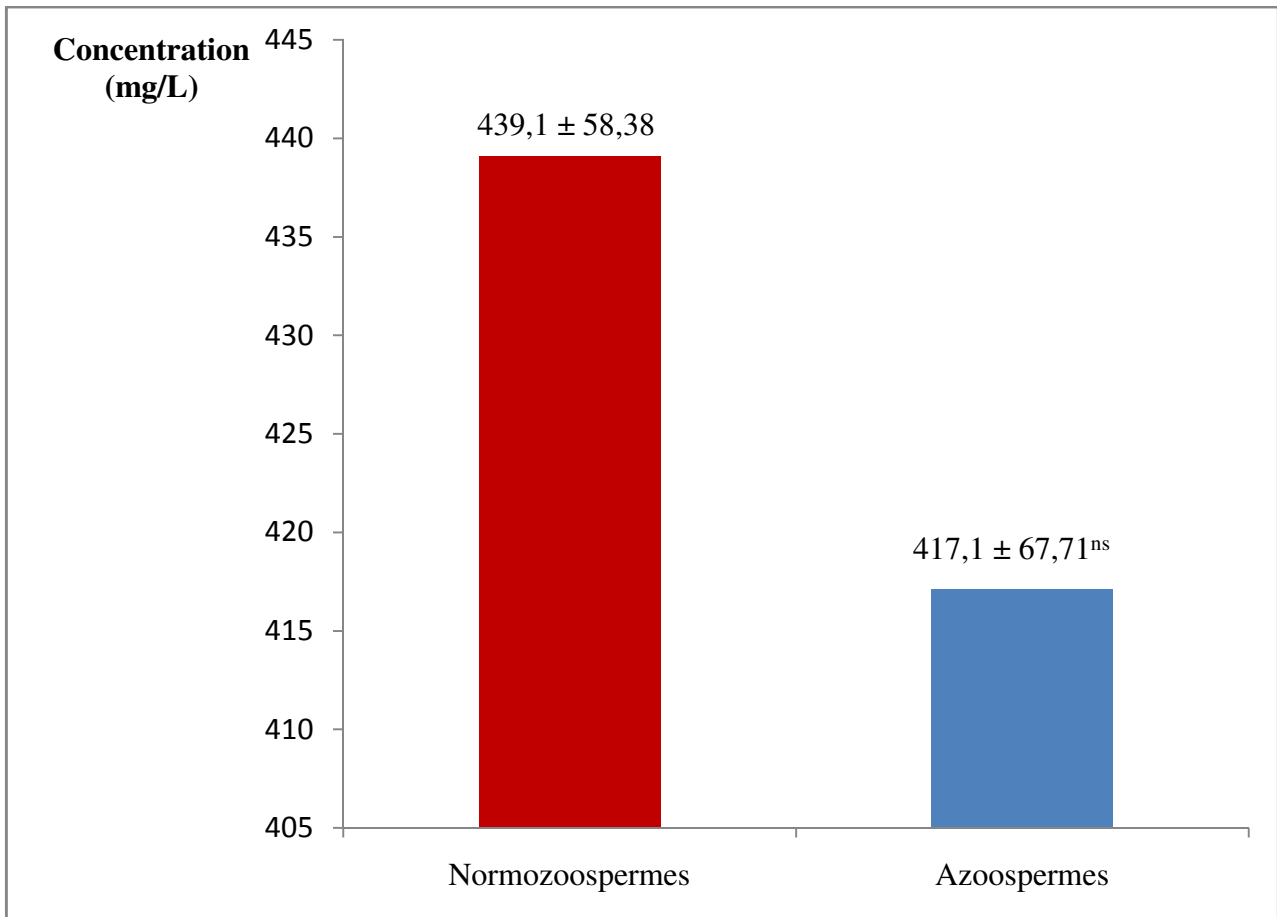
ns: non significatif ;  $p > 0,05$

**Figure 37** : Concentration en chlorure des normospermes et des azoospermes.



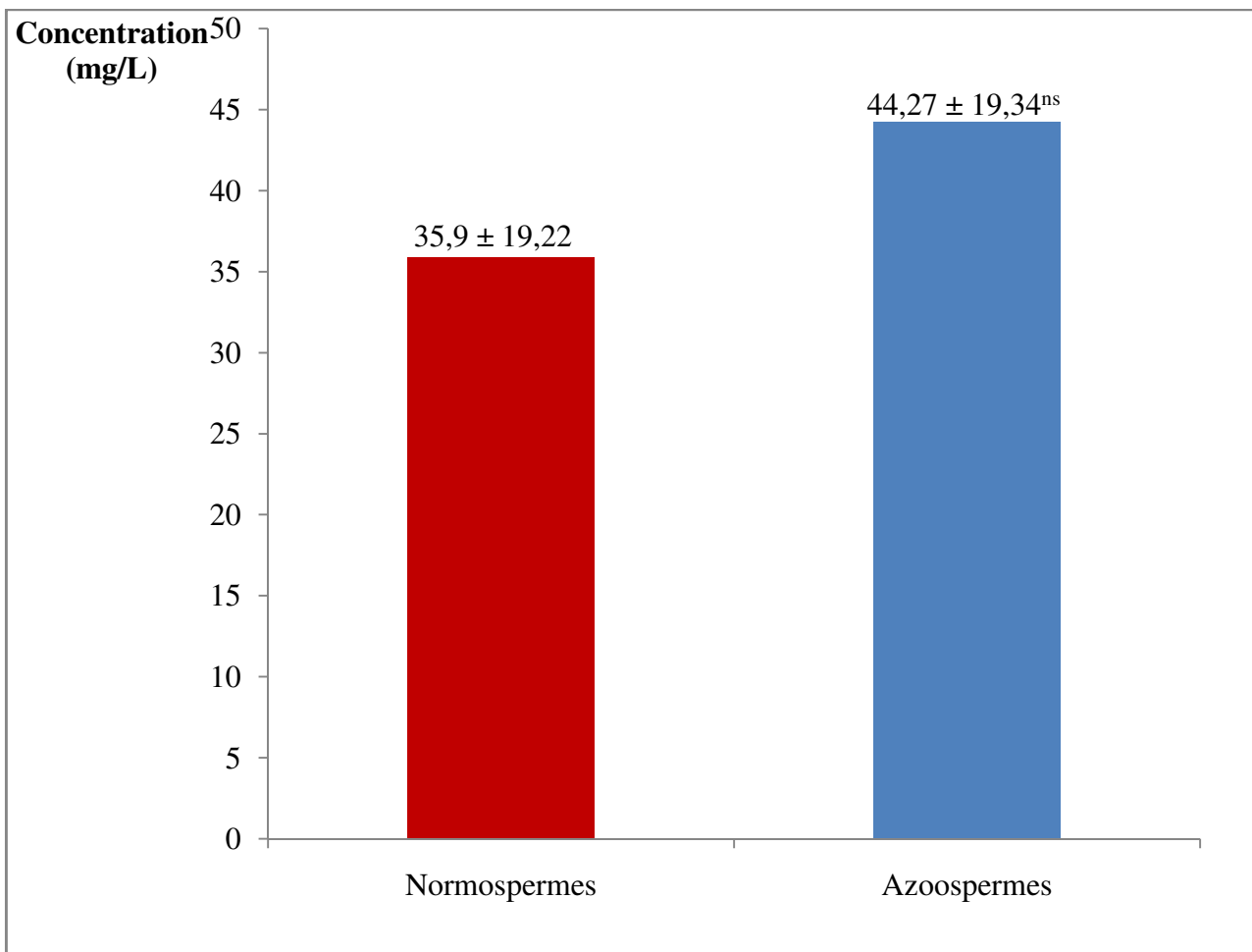
ns: non significatif ;  $p > 0,05$ .

**Figure 48** : Concentration en ion calcium des normospermes et des azoospermes.



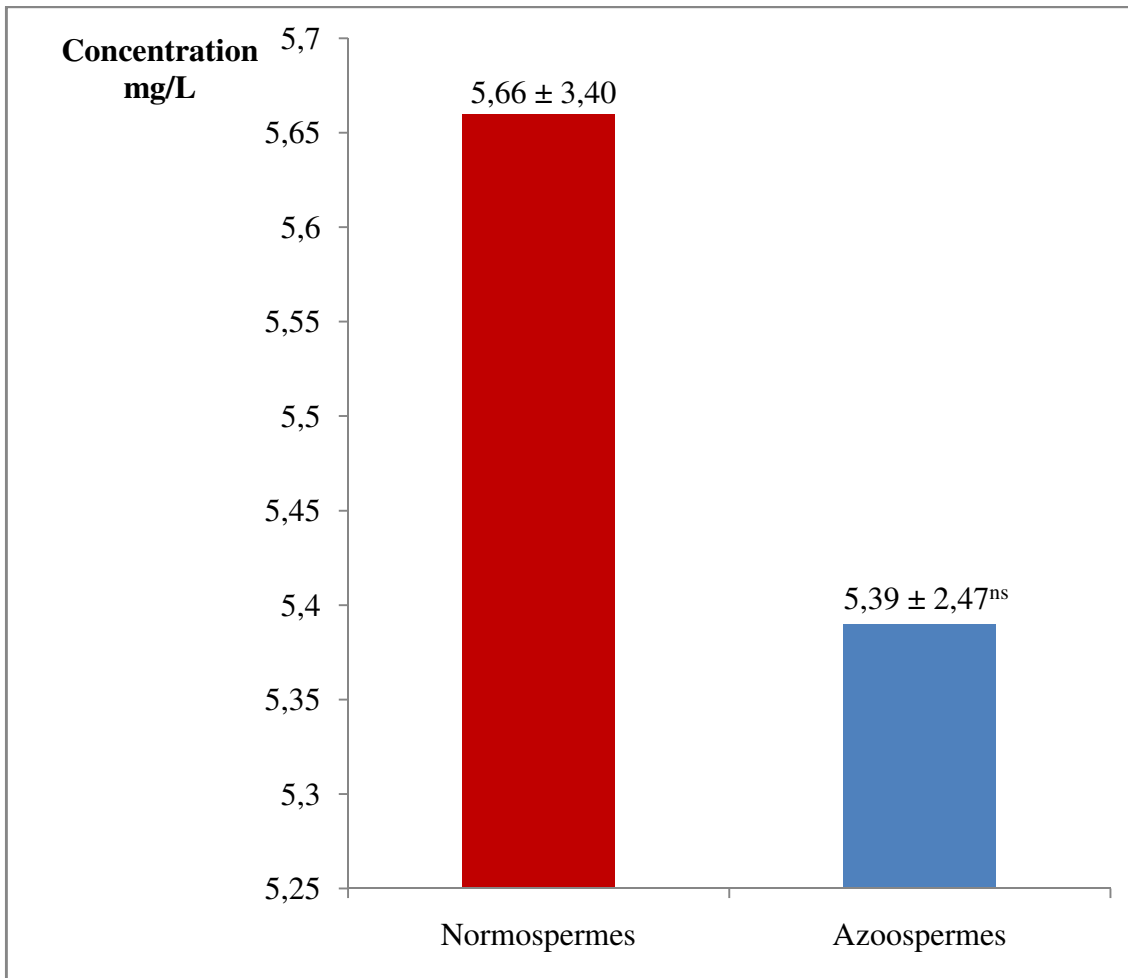
ns: non significatif ;  $p > 0,05$ .

**Figure 59** : Concentration en phosphate inorganique des normospermes et des azoospermes.



ns: non significatif ;  $p > 0,05$ .

**Figure 20** : Concentration en magnésium des individus normospermes et azoospermes.



ns : non significatif ;  $p > 0,05$ .

**Figure 26** : Concentration en fer des normospermes et des azoospermes.

L'évaluation des éléments minéraux tels que le sodium, le potassium, le chlore, le calcium, le phosphate inorganique, le magnésium et le fer a permis de relever le profil de la concentration de ceux-ci dans le plasma séminal des azoospermes et des normospermes et leur importance dans le diagnostic de l'azoospermie. La différence de concentration en éléments minéraux du plasma séminal des azoospermes et des normozoospermes ne peut servir de marqueur biochimique de différenciation de ces deux catégories de spermatozoïdes. En effet, les canaux ioniques de la membrane plasmique sont au cœur du contrôle de la fonction du spermatozoïde (**Cejudo-Roman et al., 2013**). Les flux d'ions à travers les canaux protéiques permettent un transfert de l'information entre les spermatozoïdes et leur environnement (**Shukla et al., 2012 ; Cejudo-Roman et al., 2013**). Dans les conditions physiologiques normales, le potentiel de membrane des spermatozoïdes et le pH intracellulaire sont à des valeurs telles que les canaux ioniques restent actifs à un niveau minimal. Ils sont potentiellement activés uniquement en présence d'agonistes ou de stimuli physiologiques (**Kirichok et al., 2006**). Ces différents canaux permettent de maintenir la concentration ionique constante dans le milieu extracellulaire et intracellulaire. Les échanges entre le milieu extérieur et intérieur du spermatozoïde sont alors réduits.

Le sodium est le principal cation extracellulaire. Dans le sperme, il intervient au niveau des échanges entre le plasma séminal et le spermatozoïde. Il est indispensable au maintien du pH intracellulaire et extracellulaire (**Torres-Flores et al., 2008 ; Martins et al., 2014**). La concentration moyenne en sodium du plasma séminal des azoospermes, comparée à celle des normospermes, n'est pas statistiquement significative. Le sodium ne peut alors servir de marqueur biochimique permettant de différencier le plasma séminal des azoospermes et des normospermes dans l'exploration de l'azoospermie. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par **Sakandé et al. (2012)**. Ces derniers relèvent une différence significative entre la concentration en sodium dans le plasma séminal des normospermes et ceux pathologiques. Pour **Ruskova et al. (1972)**, le sodium présente une valeur de diagnostic limitée pour les troubles du système reproducteur masculin. Néanmoins il existe une corrélation entre la mobilité des spermatozoïdes et la concentration en sodium du plasma séminal (**Marzec-Wróblewska et al., 2015**). L'osmolalité du milieu extracellulaire a un rôle primordial dans la régulation du métabolisme des spermatozoïdes. Le milieu extracellulaire est riche en sodium et en chlore alors que le milieu intracellulaire est riche en potassium et en phosphore. Les échanges de sodium entre la cellule et le milieu extérieur se font à travers des structures protéiques. Le sodium entre dans la cellule par des canaux voltage-dépendants et récepteur-dépendants, des échangeurs, des cotransporteurs, puis il en sort grâce à la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (**Torres-Flores et al., 2008 ; Shukla et al., 2012**).

La concentration en potassium du plasma séminal des azoospermes et des normospermes n'est pas significative. Le potassium ne peut servir de marqueur biochimique de différenciation entre

ceux-ci comme le confirme **Ruskova et al. 1972**. Néanmoins, il semble qu'un ratio sodium / potassium dans le plasma séminal est important pour la mobilité des spermatozoïdes et leur fonction (**Rosecrans et al., 1987**). Le potassium est le principal cation intracellulaire. Il joue un rôle déterminant dans la repolarisation cellulaire. La dépolarisation consécutive à l'entrée dans la cellule de sodium et de calcium est suivie de la repolarisation par sortie de potassium. Le retour de la cellule à l'état d'équilibre initial est assuré par la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase membranaire (**Dussol, 2010**).

L'évaluation de la concentration en chlorure du plasma séminal des azoospermes et des normospermes indique que celle-ci ne peut permettre de les différencier. Le rôle de l'ion chlorure est relativement mal connu bien qu'il s'agisse du principal anion "équilibrant" les cations sodium et potassium dans le milieu extracellulaire (**Russell, 2000**). Au niveau du spermatozoïde, l'ion chlorure intervient dans les processus d'homéostasie cellulaire, la spermatogenèse et la capacitation des spermatozoïdes (**Wertheimer et al., 2008**). Il existe des protéines membranaires tels que les co-transporteurs  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  qui assurent le transport des ions chlorure au travers de la membrane plasmique (**Wertheimer et al., 2008**).

Pour **Marín-Briggiler et al. (2003)**, l'estimation de la concentration en ions calcium du plasma séminal est indispensable car celle-ci joue un rôle important dans la mobilité et la capacitation des spermatozoïdes. Les résultats de nos travaux montrent que la concentration moyenne en ion calcium du plasma séminal des azoospermes et celle des normospermes ne présente pas de différence significative. Le calcium ne peut alors jouer le rôle de marqueur biochimique pour la différenciation des spermatozoïdes azoospermiques et normozoospermiques comme le confirme les travaux de **Wong et al. (2001)**. La présence ou l'absence de spermatozoïdes dans le sperme n'influence pas la concentration de calcium dans le plasma séminal. Par contre l'étude réalisée par **Sundaram et al. (2013)** montre que la différence de concentration en calcium du plasma séminal des hommes fertiles et infertiles présente un faible niveau de signification. Dans le sperme, le calcium se présente sous trois formes : libre, complexé ou lié à une protéine. Seule une petite portion, allant de 2 à 4% de calcium dans le sperme est présente sous forme ionisée (**Owen et Katz, 2005**). Sa concentration est plus importante dans les spermatozoïdes que dans le plasma séminal. Le transport du calcium à travers la membrane plasmique est assuré par le canal de CatSper, en association avec d'autres canaux ioniques,  $\text{Slo3}$   $\text{K}^+$  canal, les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (**Shukla et al., 2012 ; Zheng et al., 2013**). Ces canaux assurent la régulation de l'homéostasie cellulaire. L'entrée du calcium par les canaux de cations (CatSper) est essentielle pour plusieurs processus physiologiquement importants, tels que l'hyperactivation, la chimiotaxie et la réaction acrosomique (**Shukla et al., 2012**).

Le phosphore est majoritairement produit au niveau de l'épididyme (**Bretan et al., 1989**). Il intervient dans la régulation de la fertilité masculine (**Sun et al., 2015**). Les résultats de cette étude montrent que la concentration moyenne en phosphore dans le plasma séminal des normospermes et

des azoospermes ne pourrait pas servir de marqueur biochimique pour l'exploration de l'azoospermie. **Adamopoulos et Deliyannis (1983)** ont montré dans leur étude que la concentration du phosphore inorganique était plus élevée dans les spermatozoïdes asthénozoospermiques mais faible dans ceux azoospermiques et normozoospermiques. Le phosphate est l'un des anions majoritaires de la cellule où il assure l'électroneutralité en se combinant avec le potassium.

Le magnésium est présent à une concentration élevée dans le sperme (**Umeyama et al., 1986**). Il intervient en tant que cofacteur de plusieurs réactions enzymatiques impliquant le métabolisme de l'énergie (ATP) et la synthèse d'acide nucléique (**Abou-Shakra et al., 1989**). Il joue un rôle important dans la spermatogenèse, en particulier dans la motilité des spermatozoïdes. Le magnésium plasmatique a aussi un rôle physiologique important dans l'homéostasie cellulaire. La concentration en magnésium du plasma séminal des normospermes et des azoospermes ne présente pas de différence significative. Ces résultats rejoignent ceux de **Sundaram et al., (2013)**. **Umeyama et al. (1986)** révèlent à partir de leurs travaux, que la concentration en magnésium dans le plasma séminal est presque identique entre les hommes fertiles et infertiles. Il existe un gradient de concentration entre la teneur en magnésium libre du milieu extracellulaire et celle du milieu intracellulaire ainsi qu'un gradient électrique qui tendent à faire entrer le magnésium dans la cellule. Il existe des pompes à magnésium à l'instar de celles du calcium et du sodium qui font sortir le magnésium de la cellule et qui assurent l'homéostasie cellulaire (**Marzec-Wróblewska et al., 2011**).

La concentration moyenne en fer du plasma séminal des spermatozoïdes normozoospermiques est légèrement supérieure à celle des azoospermiques. Cependant, celle-ci ne présente pas de différence significative. **Marzec-Wróblewska et al. (2011)** relèvent qu'il n'existe pas de corrélation significative entre la concentration en fer des spermatozoïdes des hommes fertiles et infertiles. Le fer joue un rôle important dans la fertilité masculine et la spermatogenèse (**Aydemir et al., 2006**). La capacité du fer à servir à la fois de donneur d'électrons et d'accepteur rend ce métal irremplaçable pour diverses voies métaboliques et physiologiques. En effet, il entre dans la composition de nombreuses enzymes et métalloprotéine. Seule une infime partie du fer est sous forme libre et le moindre excès de fer libre est toxique pour l'organisme. Dans le plasma séminal, on note la présence de protéines spécialisées qui règlent l'homéostasie. Elles sont impliquées dans le transport du fer et dans la régulation de son métabolisme (**Kwenang et al., 1987**).

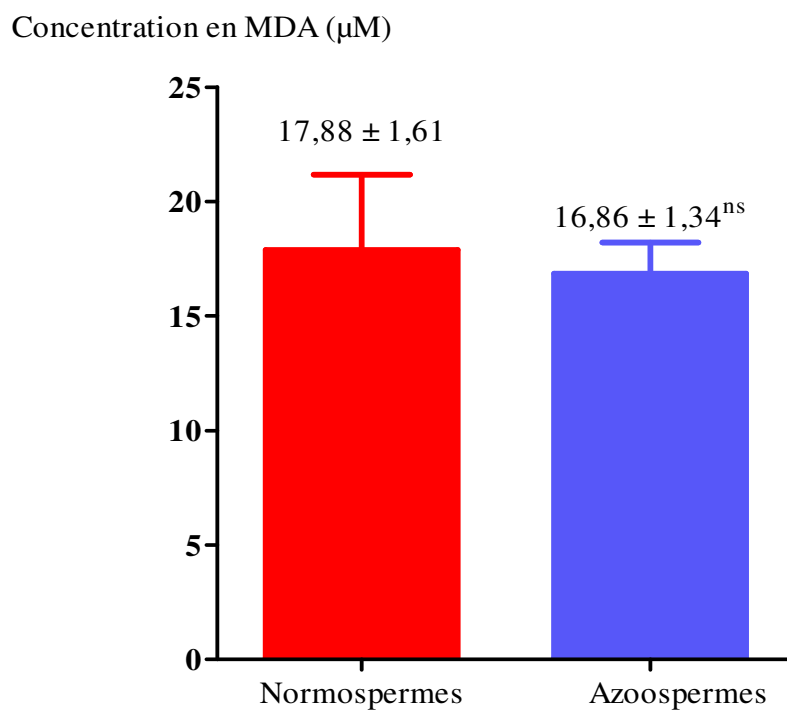


## II.2. Evaluation du stress oxydatif du plasma séminal

L'identification des marqueurs du stress oxydatif dans le plasma séminal des normospermes et des azospermes a permis de déterminer la concentration moyenne en MDA de ceux-ci.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative ( $p > 0,05$ ) entre la concentration du plasma séminal en MDA des individus normospermes ( $17,88 \pm 1,61\mu\text{M}$ ) et ceux azospermes ( $16,86 \pm 1,34 \mu\text{M}$ ) (**Figure 22**).

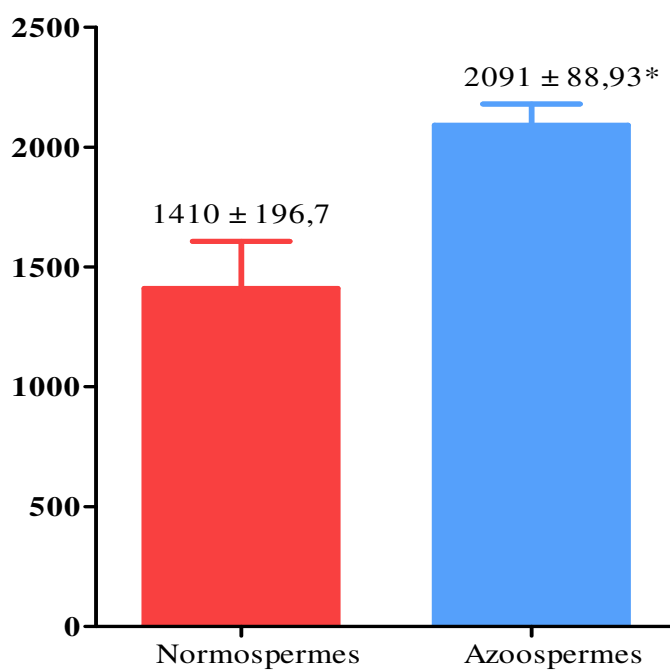
L'activité antioxydante totale des azospermes ( $2091 \pm 88,93 \mu\text{M}$ ) a été supérieure à celle des normospermes ( $1410 \pm 196,7 \mu\text{M}$ ). La différence de la TAC entre les individus normozoospermes et azospermes était significative avec une  $p$ -value inférieure à 0,05 (**Figure 23**).



ns : non significatif ;  $p > 0,05$ .

**Figure 22** : Concentration moyenne en malonyldialdehyde du plasma séminal des normospermes et des azoospermes.

Concentration de la TAC ( $\mu\text{M}$ )



\* : les moyennes présentent une différence significative ( $p < 0,05$ ).

**Figure 23** : Activité Antioxydante Totale (TAC) du plasma séminal des normospermes et des azoospermes.

De nombreux auteurs indiquent la présence du MDA dans le sperme (**Abdul-Rasheed, 2010 ; Shiva et al., 2011**). Il est important de signifier qu'une augmentation de la concentration du plasma séminal en ERO a été signalée chez 40% des hommes infertiles (**Shiva et al. 2011**). Ainsi le dosage du MDA est utilisé en général dans les analyses biochimiques pour surveiller le degré d'altérations peroxydatives des spermatozoïdes (**Chari et Colagar, 2011**). La concentration élevée en MDA du plasma séminal correspond à une peroxydation lipidique importante qui a pour conséquence la baisse de la fertilité (**Laudat et al., 1999 ; Camejo et al., 2001 ; Chari et Colagar, 2011**). Ceci est une caractéristique du stress oxydant et marque un déséquilibre de la balance entre les ERO et les antioxydants (**Sharma et Agarwal, 1996 ; De Lamirande et al., 1997 ; Agarwal et al., 2006**).

Les résultats obtenus dans notre étude indiquent que la teneur en MDA des spermatozoïdes azoospermiques et normozoospermiques ne présentent pas de différence significative. Le MDA ne peut alors servir de marqueur biochimique pour la différenciation des spermatozoïdes azoospermiques et normozoospermiques. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Suleiman et al. (1996)** qui relèvent qu'il n'existe aucune corrélation négative significative entre le taux du MDA dans le plasma séminal et le nombre de spermatozoïdes. Quand à **Haiba et al. (2014)**, ils ont montré que le taux du MDA du plasma séminal n'est pas corrélé à la concentration et à la mobilité des spermatozoïdes. Par contre **Shiva et al. (2011)**, ainsi que **Abdul-Rasheed (2010)**, affirment qu'il existe une élévation significative de la concentration en MDA des spermatozoïdes azoospermiques par rapport à ceux normozoospermiques. **Abdul-Rasheed (2010)** conclut que l'azoospermie, l'oligozoospermie et l'asthénozoospermie sont associées à une augmentation de la concentration en MDA dans le plasma séminal. De même **Huang et al. (2000)** indiquent que la concentration en MDA des spermatozoïdes normozoospermiques, est significativement inférieure à celle des spermatozoïdes asthénozoospermiques et oligoasthénospermiques. **Li et al. (2004)** notent une différence significative uniquement entre le taux de MDA du plasma séminal des spermatozoïdes présentant une azoospermie non obstructive et ceux normozoospermiques.

L'absence de spermatozoïdes dans les spermatozoïdes azoospermiques indiquent que la présence du MDA ne peut traduire la peroxydation lipidique des spermatozoïdes. **Huang et al. (2000)** suggèrent que la concentration en MDA du plasma séminal ne provient pas uniquement des spermatozoïdes, mais elle peut aussi avoir pour origine la peroxydation des lipides se produisant dans la prostate, les vésicules séminales, et d'autres organes accessoires. Aussi la formation du MDA n'est pas spécifique des lipides. Elle peut se produire au cours de l'activation de la voie de la cyclo-oxygénase, et apparaître au cours de l'interaction du radical hydroxyle avec la vitamine C ou avec le désoxyglucose (**Janero, 1990**).

La mesure de la TAC au cours de notre étude a présenté une différence significative entre le plasma séminal des normospermiques et des azoospermiques. Le plasma séminal contient de nombreux

antioxydants qui agissent comme piègeurs des radicaux libres. Ils assurent la protection des spermatozoïdes contre le stress oxydatif (**Giannattasio et al., 2002 ; Nouri et al., 2008 ; Kand'ár et al., 2011**). Son dosage dans le plasma séminal permet d'apprécier son aptitude à neutraliser les ERO. Elle évalue l'effet cumulatif de tous les antioxydants présents dans celui-ci, mais sans les individualiser (**Mahfouz et al., 2009 ; Ko et al., 2014**).

Cette étude a montré que la valeur de la capacité antioxydante totale des spermatozoïdes azoospermiques est élevée par rapport à celle des spermatozoïdes normozoospermiques. Par contre il a été relevé que le plasma séminal des hommes fertiles a une plus grande capacité antioxydante totale que celui des hommes infertiles (**Lewis et al., 1997 ; Mahfouz et al., 2009 ; Benedetti et al., 2012**). **Shiva et al. (2011)** ont montré que la concentration moyenne de la superoxyde dismutase (SOD) était significativement basse dans le plasma séminal des spermatozoïdes azoospermiques. Pour la catalase et l'acide ascorbique, **Shiva et al., (2011)** n'ont pas trouvé de différence significative entre les concentrations dans les spermatozoïdes normozoospermiques et azoospermiques. **Mahfouz et al. (2009)** définissent un niveau de la TAC de 1420  $\mu\text{M}$  à partir duquel l'on peut définir un spermatozoïde fertile. Mais cela n'est pas en accord avec nos résultats du fait d'une hausse de la TAC chez les spermatozoïdes azoospermiques bien que nous ayons obtenus une TAC de 1410  $\mu\text{M}$  chez les normospermiques.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que l'activité antioxydante n'est pas déficitaire chez les spermatozoïdes azoospermiques. En effet, la production d'antioxydants est exprimée dans plusieurs tissus de l'appareil reproducteur mâle, y compris les testicules, l'épididyme, la prostate et les vésicules séminales. Il est possible que l'expression des antioxydants dans ces tissus soit régulée à la hausse en réponse à la spermatogenèse défectueuse. Mais il est important de noter que les antioxydants présents dans le plasma séminal sont essentiels pour maintenir la fertilité masculine, mais l'excès de ceux-ci peuvent également provoquer l'effet inverse (**Faure et al., 2011**). La TAC peut servir de marqueur biochimique de différenciation entre l'azoospermie et la normozoospermie. Ces résultats confortent l'idée que les niveaux élevés des ERO détectés dans certains cas d'infertilité masculine sont principalement dus à leur production excessive et non à une défaillance de l'activité antioxydante du plasma séminal.

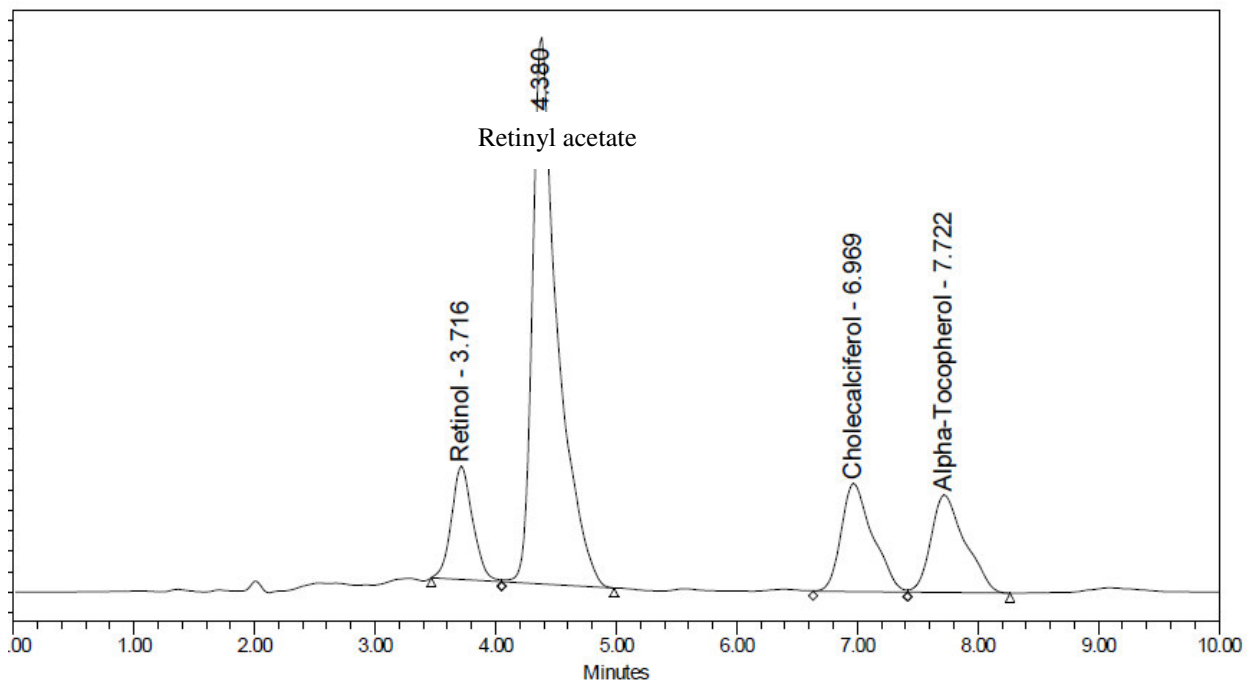
### II.3. Evaluation des vitamines liposolubles dans le plasma séminal

Les résultats obtenus confirment une présence infinitésimale des vitamines A, D et E dans le plasma séminal avec des temps de rétention respectifs de 3,716 min, 6,969 min et 7,722 min (**Figure 24**).

Ainsi, la concentration en vitamine A a été de  $1,66 \pm 1,81$  mg/L chez les normospermes contre une concentration moyenne de  $0,28 \pm 0,52$  mg/L chez les azospermes (**Figure 25**). La différence de concentration en vitamine A des normospermes et des azospermes était significative (**Tableau II**).

La concentration moyenne de la vitamine D chez les normospermes a été de  $0,27 \pm 0,40$  mg/L (**Figure 26**). Cette valeur était chez les azospermes de  $0,08 \pm 0,12$  mg/L. Ces valeurs ne présentent pas de différence significative (**Tableau III**).

Pour la vitamine E les résultats obtenus montrent une concentration moyenne de  $2,56 \pm 3,58$  mg/L chez les normospermes contre une concentration de  $0,33 \pm 0,51$  mg/L chez les azospermes (**Figure 27**). Ces résultats présentent une différence significative (**Tableau IV**).

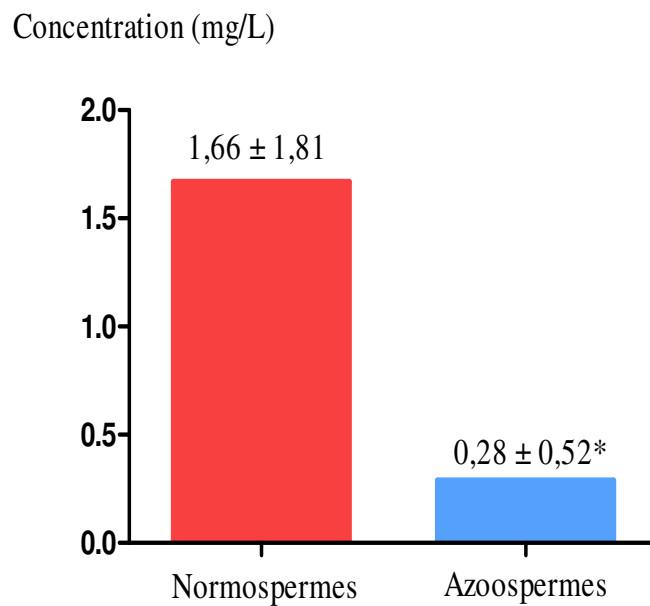


	Peak Name	RT (min)	Area ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )	% Area	Height ( $\mu\text{V}$ )	% Height	Amount
1	Retinol	3.716	13533	10.47	1110	13.09	10.000
2		4.380	77594	60.06	5355	63.14	
3	Cholecalciferol	6.969	19291	14.93	1061	12.51	1.000
4	Alpha-Tocopherol	7.722	18782	14.54	955	11.26	20.000

	Units
1	mg/L
2	

	Units
3	mg/L
4	mg/L

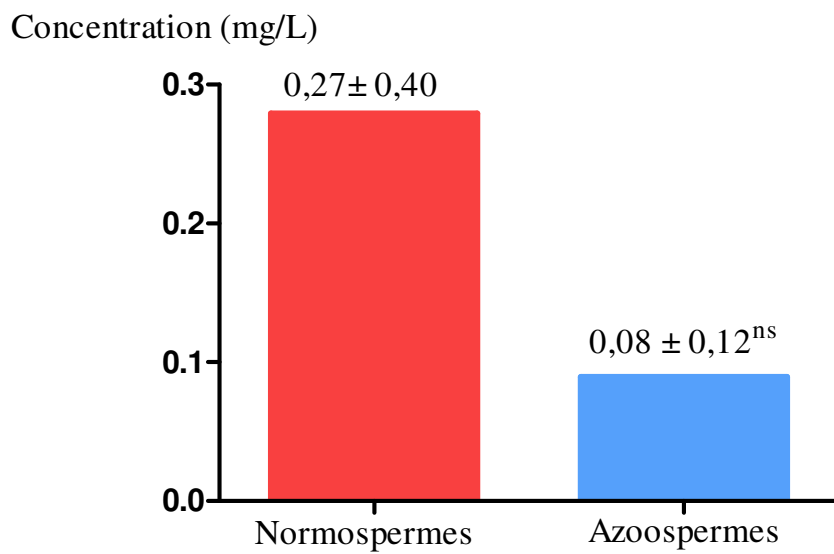
**Figure 24** : Profil chromatographique et du temps de rétention des vitamines A, D et E à la détection de 280 nm.



\* : les moyennes présentent une différence significative ( $p < 0,05$ )

**Figure 25** : Concentration moyenne de la vitamine A du plasma séminal des normospermes et des azoospermes.

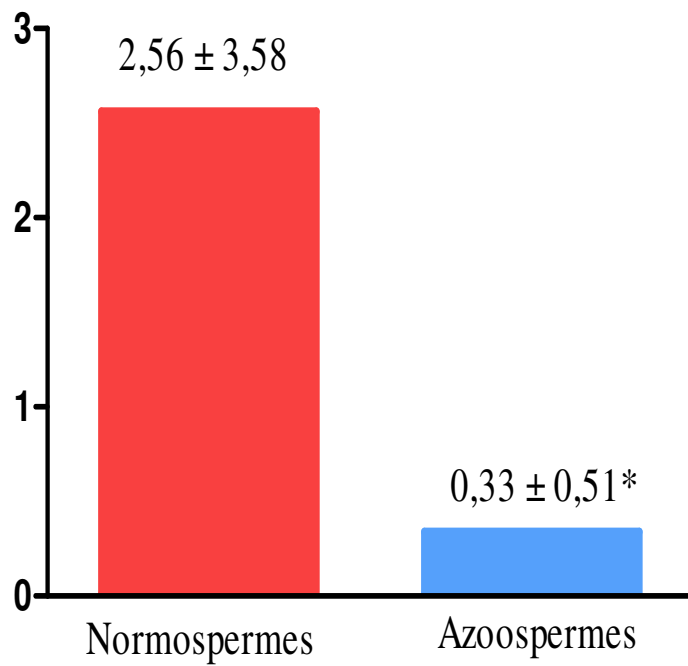




ns : non significatif ;  $p > 0,05$

**Figure 26** : Concentration moyenne de la vitamine D du plasma séminal des normospermes et des azoospermes.

Concentration (mg/L)



\* : La différence est significative ( $p < 0,05$ )

**Figure 27** : Concentration moyenne en vitamine E du plasma séminal des normospermes et des azoospermes.

**Tableau II** : Données statistiques de la concentration en vitamine A

	<b>Normospermes</b>	<b>Azoospermes</b>
<b>Maximun (mg/L)</b>	6,350	1,779
<b>Minimun (mg/L)</b>	0,002	0,0020
<b>Moyenne ± Ecart type (mg/L)</b>	1,668± 1,819	0,2871± 0,5201
<b>P-value</b>	0,0003	
<b>Significativité</b>	Significatif	

\*Différence de moyenne significative ( $p < 0,05$ )

**Tableau III** : Données statistiques de la concentration en vitamine D

	<b>Normospermes</b>	<b>Azoospermes</b>
<b>Maximun (mg/L)</b>	1,860	0,3950
<b>Minimun (mg/L)</b>	0,0010	0,0010
<b>Moyenne ± Ecart type (mg/L)</b>	0,2792± 0,4082	0,0894± 0,1239
<b>P-value</b>	0,1947	
<b>Significativité</b>	Non significatif	

\*Différence de moyenne significative ( $p < 0,05$ )

**Tableau IV** : Données statistiques de la concentration en vitamine E

	<b>Normospermes</b>	<b>Azoospermes</b>
<b>Maximun (mg/L)</b>	11,20	1,657
<b>Minimun (mg/L)</b>	0,0060	0,0080
<b>Moyenne ± Ecart type (mg/L)</b>	2,561± 3,589	0,3399± 0,5148
<b>P-value</b>	0,0035	
<b>Significativité</b>	Significatif	

\*Différence de moyenne significative ( $p < 0,05$ )

Les vitamines, notamment le rétinol, le cholécalciférol et le tocophérol sont impliquées dans les fonctions reproductrices.

Les résultats de cette étude ont montré que la concentration en rétinol du plasma séminal des spermatozoïdes normozoospermiques a été supérieure à celle des azoospermiques. En effet, de nombreux auteurs notent qu'une carence en vitamine A affecte la fertilité masculine (**Abdulkareem et al., 2005**). La vitamine A est impliquée dans la régulation de la fonction des testicules en agissant sur les cellules de Sertoli, les cellules germinales et les cellules de Leydig (**Raverdeau et al., 2012**). Elle assure la régulation transitoire de la sécrétion de la testostérone chez les rongeurs et chez l'homme. Elle intervient aussi dans la prolifération et la différenciation des spermatogonies de type A, la transition entre les spermatides ronds et allongés et la spermiation (**Nourashrafeddin, 2015**). Chez les adultes, la carence en vitamine A entraîne un arrêt de la spermatogenèse (**Chen et al., 2016**).

La différence de concentration en rétinol du plasma séminal des azoospermiques et des normospermiques a été significative. Ceci nous permet d'affirmer que le rétinol peut servir de marqueur biochimique de différenciation des normospermiques et des azoospermiques. Cette étude rejoint celle de **Ghyasvand et al. (2015)** qui conclut que le dosage du rétinol dans le diagnostic et le traitement de l'infertilité idiopathique peut être utile. **Kand'ár et al. (2014)** affirme qu'il existe une corrélation significative entre la concentration de rétinol et celle des spermatozoïdes. Cette étude a aussi montré chez certains patients, une faible concentration de la vitamine A dans le plasma séminal, avec un spermogramme normal qui traduit un bon fonctionnement des testicules.

La concentration en vitamine D du plasma séminal des azoospermiques a été inférieure à celle des normospermiques et ne présentait pas de différence significative. Cette différence non significative indique que la vitamine D ne peut servir de biomarqueur de différenciation entre les azoospermiques et les normospermiques. Certains normospermiques présentaient de faibles taux de vitamine D dans leur plasma séminal. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Boisen et al., (2016)** qui ont montré que chez des hommes normospermiques, les taux sériques de vitamine D n'étaient pas corrélés avec les paramètres du sperme et les hormones reproductrices (FSH, LH, testostérone), tandis que la mobilité des spermatozoïdes présentait une corrélation positive avec la vitamine D.

La vitamine D est une molécule de signalisation polyvalente ayant un rôle établi dans la régulation de l'homéostasie du calcium. Elle joue un rôle important dans la fertilité masculine (**He et al., 2015**). En effet, les récepteurs de celle-ci (VDR) et les enzymes la métabolisant sont présents dans les gonades, le tractus reproducteur et sur les spermatozoïdes humains (**Blomberg, 2014**). Il est intéressant de noter que les taux d'expression du VDR et de l'enzyme inactivant la vitamine D CYP24A1 dans les spermatozoïdes humains servent de marqueurs prédictifs positifs de

la qualité du sperme. Leur expression est plus élevée dans les spermatozoïdes des normozoospermes que ceux infertiles (**Boisen *et al.*, 2016**).

L'évaluation de la teneur en alpha tocophérol du plasma séminal des spermatozoïdes azoospermiques et normozoospermiques a montré que la différence de concentration de ces deux groupes est significative. Elle a aussi montré que la concentration en vitamine E des spermatozoïdes normozoospermiques était supérieure à celle des azoospermes. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Bhardwaj *et al.* (2000)** qui affirment que le taux de vitamine E dans le plasma séminal des azoospermes est faible comparativement à celui des normospermes. Cette étude nous permet de conclure que la vitamine E peut servir de biomarqueur de différenciation des azoospermes et des normospermes. Par contre, **Nouri *et al.* (2008)** ont montré que la concentration en vitamine E du plasma séminal avait une moindre valeur de diagnostic. Néanmoins **Therond *et al.* (1996)** relève qu'il existe une corrélation entre la teneur en vitamine E et la mobilité des spermatozoïdes. Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que le taux de la vitamine E dans le plasma séminal n'influence pas la normalité du spermogramme. En effet certains hommes normozoospermiques présentaient une faible teneur en vitamine E du plasma séminal. Aussi, il faut noter que l'alpha-tocophérol est le principal composé antioxydant à phase lipidique du groupe des vitamines E. Il est impliqué dans le piégeage des espèces réactives de l'oxygène (**Gvozdjaková *et al.*, 2015**). La présence de l'alpha-tocophérol dans la phase aqueuse du plasma séminal plutôt que dans les membranes des spermatozoïdes où il est négligeable, le rend plus accessible aux ascorbates qui assurent sa régénération (**Nouri *et al.* 2008**).

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



L'étude de l'identification de nouveaux marqueurs biochimiques de l'azoospermie nous a permis de présenter le profil spermiologique des patients reçus à l'IPCI. Ainsi, le taux de normozoospermie était de 2%. L'anomalie la plus représentée était la tératozoospermie avec un taux de 39,71 %. L'azoospermie représentait 3,89 %. L'anomalie associée la plus rencontrée était l'astheno-tératozoospermie. Le faible taux de normozoospermie peut s'expliquer par le fait que cette étude a été réalisée en milieu hospitalier et les patients étaient reçus à l'IPCI sous indication du médecin pour un désir de paternité en général. Aussi la recherche de nouveaux marqueurs biochimiques discriminatifs de l'azoospermie offre de nouvelles perspectives pour l'amélioration du diagnostic de cette pathologie. L'évaluation de la concentration des éléments minéraux tels que le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le phosphore, le chlore et le fer dans le plasma séminal des azoospermes et des normozoospermes, nous a permis de montrer que ceux-ci ne présentent pas de valeur de diagnostic pour l'azoospermie, bien que jouant un rôle important dans le fonctionnement et le maintien de la fertilité masculine. La détermination de la concentration en MDA dans le plasma séminal des azoospermes et celui des normozoospermes ne représente pas un marqueur biochimique de différenciation de l'azoospermie. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que l'activité antioxydante n'est pas déficitaire chez les azoospermes. La TAC peut servir de marqueur biochimique de l'azoospermie. Ces résultats confortent l'idée que les niveaux élevés des ERO détectés dans certains cas d'infertilité masculine sont principalement dus à leur production excessive et non à une défaillance de l'activité antioxydante du plasma séminal. Le dosage des vitamines A, E, D, dans le plasma séminal des azoospermes et des normozoospermes a montré que les vitamines A et E remplissent les critères de biomarqueur de différenciation de ces deux catégories de sperme. La concentration en vitamines D dans le plasma séminal des azoospermes et des normozoospermes ne présentait pas de valeur de diagnostic pour l'azoospermie.

En perspective, plusieurs approches de recherche se dégagent de cette étude. Il s'agira d'évaluer la concentration des vitamines A, E et la TAC dans le plasma séminal des différentes catégories de spermatozoïdes pathologiques afin de pouvoir mieux définir l'impact de celles-ci dans l'infertilité masculine. Il serait aussi indispensable de déterminer le rôle précis des biomarqueurs identifiés dans le diagnostic de l'azoospermie sécrétoire et excrétoire.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Abdulkareem T. A., Al-Haboby A. H., Al-Mjamei S. M. & Hobi A. A., 2005** - Sperm abnormalities associated with vitamin A deficiency in rams. *Small Ruminant Research*, **57(1)** : 67-71.

**Abdul-Rasheed O. F., 2010** - Association between seminal plasma copper and magnesium levels with oxidative stress in iraqi infertile men. *Oman Medical Journal* **25(3)** : 168-72.

**Abou-Shakra F. R., Ward N. I., & Everard D. M., 1989** - The role of trace elements in male infertility. *Fertility and Sterility*, **52(2)** : 307-310.

**Adamopoulos D. A. & Deliyiannis V., 1983** - Seminal plasma magnesium, calcium and inorganic phosphate concentration in normozoospermic and subfertile men. *Andrologia*, **15(6)** : 648-654.

**Agarwal A., Sharma R. K., Nallella K. P., Thomas A. J. Jr, Alvarez J. G. & Sikka S. C., 2006** - Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertility and Sterility*, **86(4)** : 878-885.

**Akinloye O., Abbiyesuku F. M., Oguntibeju O. O., Arowojolu A. O. & Truter E. J., 2011** - The impact of blood and seminal plasma zinc and copper concentrations on spermogram and hormonal changes in infertile Nigerian men. *Reproductive Biology*, **11(2)** : 83-98.

**Alvarez J. G. & Storey B. T., 1995** - Differential Incorporation of Fatty Acids Into and Peroxidative Loss of Fatty Acids From Phospholipids of Human Spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, **42(3)** : 334-346.

**Aumüller G. & Riva A., 1992** - Morphology and functions of the human seminal vesicle. *Andrologia*, **4(4)** : 183-196.

**Aydemir B., Kiziler A. R., Onaran I., Alici B., Ozkara H. & Akyolcu M. C., 2006** - Impact of Cu and Fe concentrations on oxidative damage in male infertility. *Biological Trace Element Research*, **112(3)** : 193-203.

**Bahi G.A., 2017** - Evaluation du statut en micronutriments essentiels chez des tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) de la ville d'Abidjan, Côte d'Ivoire. Mémoire de Thèse de l'Université Félix Houphouët Boigny Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 127p.

**Ball G. F. M., 2008** - Vitamin A : Retinoids and Carotenoids. *Vitamins: their role in the human body*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford (Grande-Bretagne), pp133-187.

**Banjoko S. O., Adeseolu F. O., 2013** - Seminal Plasma pH, Inorganic Phosphate, Total and Ionized Calcium Concentrations In The Assessment of Human Spermatozoa Function. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, **7(11)** : 2483-2486.

**Beauchamp P. J., Galle P. C. & Blasco L., 1984** - Human sperm velocity and postinsemination cervical mucus test in the evaluation of the infertile couple. *Archives of Andrology*, **13(2-3)** : 107-12.

**Ben Ali H., Atig F., Mehri S., Saad A. & Ajina M., 2012** - Analyse du statut oxydatif spermatique chez des patients infertiles. *Andrologie*, **22(4)** : 233-240.

**Benahmed M., Mauduit C. & Hamamah S., 2000** - Spermatogenèse et facteurs de croissance. <http://www.lesjta.com/article>. consulté le 08 Juil, 2015,1.

**Benedetti S., Tagliamonte M. C., Catalani S., Primiterra M., Canestrari F., De Stefani S., Palini S. & Bulletti C., 2012** - Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reproductive Biomedicine Online*, **25(3)** : 300-306.

**Benzie I. F. F. & Strain J. J., 1996** - The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, **239(1)** : 70-76.

**Berbis P., 2010** - Rétinoïdes : mécanismes d'action. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, **137(3)** : 97-103.

**Bertrand-Delepine J., Leroy C., Rigot J.M., Catteau-Jonard S., Dewailly G., Robin D., 2016** - Stimulation de la spermatogenèse : pour qui ? Pourquoi ? Comment ? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, **44(9)** : 505-516.

**Bhardwaj A., Verma A., Majumdar S. & Khanduja K. L., 2000** - Status of vitamin E and reduced glutathione in semen of oligozoospermic and azoospermic patients. *Asian Journal of Andrology*, **2(3)** : 225-8.

- Blomberg J. M., 2012** - Vitamin D metabolism, sex hormones, and male reproductive function. *Reproduction*. **144(2)** : 135-52.
- Blomberg J. M., 2014** - Vitamin D and male reproduction. *Nature Reviews Endocrinology*, **10(3)** : 175-86.
- Boisen I. M., Bøllehuus Hansen L., Mortensen L. J., Lanske B., Juul A., & Blomberg J. M., 2016** - Possible influence of vitamin D on male reproduction. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **173** : 215-222.
- Bramley P. M., Elmadfa I., Kafatos A., Kelly F. J., Manios Y., Roxborough H. E., Schuch W., Sheehy P. J.A. & Wagner K. H., 2000** - Vitamin. E. *Journal of the Science of Food and agriculture*, **80(7)** : 913-938.
- Bretan P. N., Vigneron D. B., Mc Clure R. D., Hricak H., Tom R. A., Moseley M., Tanagho E. A. & James T. L., 1989** - Assessment of male infertility: Correlation between results of semen analysis and phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *Urology*, **33(2)** : 116-9.
- Camejo M. I., Segnini A. & Proverbio F., 2001** - Interleukin-6 (IL-6) in seminal plasma of infertile men, and lipid peroxidation of their sperm. *Archives of Andrology*, **47(2)** : 97-101.
- Cejudo-Roman A., Pinto F. M., Subirán N., Ravina C. G., Fernández-Sánchez M., Pérez-Hernández N., Pérez R., Pacheco A., Irazusta J. & Candenias L., 2013** - The voltage-gated sodium channel nav1.8 is expressed in human sperm. *PLoS One*, **8(9)** : e76084.
- Chari M. G. & Colagar A. H., 2011** - Seminal plasma lipid peroxidation, total antioxidant capacity, and cigarette smoking in asthenoteratospermic men. *Journal of Men's Health*, **8(1)** : 43-49.
- Chen Y., Ma L., Hogarth C., Wei G., Griswold M. D. & Tong M. H., 2016** - Retinoid signaling controls spermatogonial differentiation by regulating expression of replication-dependent core histone genes. *Development*. **3(9)** : 1502-1511.

**Cheng C. Y. & Mruk D. D., 2013** - Spermatogenesis, Mammals. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Second Edition. Sydney Brenner, Jeffrey Miller. Californie (USA), pp 525-528

**Coat C., Perrin A., Talagas M., Tetefort R., Amice J., Valéri A., De Braekeleer M. & Amice V., 2011** - Azoospermie : prise en charge et résultats. À propos de 90 cas. *Progrès en Urologie*, **21(13)** : 946-954.

**Cochard L. R., 2015** - Atlas d'embryologie humaine de Netter. De Boeck Supérieur (France), 290 p.

**Coujard R. & Poirier J. (1980)** - Précis d'histologie humaine. *Presses Université Laval*, Laval (Canada) 752p.

**Coulibaly F. A., Ayékoué J. E., N'Zi K. S., N' Guessan M. F., Méité S., M'Boh G. M. & Djaman A. J., 2014a** - Comparative study of the metabolic markers of the seminal fluid between normospermia and azoospermia. *International Journal of Innovative and Applied Research*, **2(6)** : 26- 32.

**Coulibaly F. A., N' Zi K. S., Ayekoué J. E., Coulibaly N., Yaye Y. G. & Djaman A. J., 2014b** - Comparative study of enzymatic markers in seminal liquids of Normospermic and Azoospermic samples at Pasteur Institute of Cote D'Ivoire (IPCI). *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, **2(11)** : 1252-1261

**Daly J.A. & Ertingshausen G., 1972** - Direct method for inorganic phosphate determination. *Clinical Chemistry*, **18** : 263-265.

**Dayalu E. & Kittok R. J., 1996** - Negative feedback on luteinizing hormone secretion requires infrequent exposure to testicular androgens. *Animal Reproduction Science*, **44(1)** : 55-69.

**De Lamirande E., Jiang H., Zini A., Kodama H. & Gagnon C., 1997** - Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, **2(1)** : 48-54.

**Deffieux X. & Antoine J. M., 2003** - Inhibines, activines et hormone anti-müllérienne : structure, signalisation, rôles et valeur prédictive en médecine de la reproduction. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, **31(11)** : 900-911.

**Dillenseger J.P., 2011** - Atlas D'anatomie Générale et Radiologique, Elsevier Masson. France, 304 p.

**Dubest C. & Pugeat M., 2000** - Gonadotrophines hypophysaires : physiologie et exploration fonctionnelle. *EMC - Endocrinologie*, **2(4)** : 231-240.

**Dumont A., Barbotin A. L., Lefebvre-Khalil V., Mitchell V., Rigot J. M., Boitrelle F., Robin G., 2017** - La necrozoospermie : du diagnostic étiologique à la prise en charge thérapeutique. *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie*, **45(4)** : 238-248.

**Dussol B., 2010** - Équilibre potassique, hypokaliémie et hyperkaliémie. *Néphrologie & Thérapeutique*, **6(3)** : 180-199.

**Esfandiari N., De Lamirande E., Gukturk A., San Gabriel M. C., Nazemian Z., Burjaq H., Casper R. F., Zini A., 2014** - Seminal hyperviscosity is not associated with semenogelin degradation or sperm deoxyribonucleic acid damage: a prospective study of infertile couples. *Fertility and Sterility*, **101(6)** : 1599-1603

**Faure C., Dupont C., Sermondade N. & Lévy R., 2011** - Antioxydants et infertilité masculine. *Médecine thérapeutique / Médecine de la reproduction, gynécologie et endocrinologie*, **13(4)** : 275-83.

**Ferguson J.W., Richard J.J., O'Laughlin J.W. & Banks C.V., 1964** - Simultaneous spectrophotometric determination of calcium and magnesium with chlorophosphonazo III. *Analytical Chemistry*, **36 (4)** : 796-799.

**Follingan K., Tamini S. F. B., Ouedraogo H. G., Feteke L., Tiendrebeogo S., James Y. E., Amegbor K., Darre T. & Boukari B. S., 2011** - Exploration de l'infertilité masculine : Techniques et Anomalies du spermogramme et du spermocytogramme en pratique privée à Ouagadougou (Burkina Faso). *Journal de la Recherche Scientifique de l'Universite de Lome*, **13(2)**.

**Gharagozloo P. & Aitken R. J., 2011** - The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human Reproduction*, **26(7)** : 1628-1640.

**Ghyasvand T., Goodarzi M. T., Amiri I., Karimi J. & Ghorbani M., 2015** - Serum levels of lycopene, beta-carotene, and retinol and their correlation with sperm DNA damage in normospermic and infertile men. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, **13(12)** : 787-92.92.

**Giannattasio A., De Rosa M., Smeraglia R., Zarrilli S., Cimmino A., Di Rosario B., Ruggiero R., Colao A. & Lombardi G., 2002** - Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. *Journal of Endocrinological Investigation*, **25(11)** : 983-986.

**Guichaoua M. R., Geoffroy-Siraudin C., Mercier G., Achard V., Paulmyer-Lacroix O. & Metzler-Guillemain C., 2009** - Aspects génétiques de la tératozoospermie. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, **37(6)** : 540-545.

**Gvozdjaková A., Kucharská J., Dubravicky J., Mojto V. & Singh R. B., 2015** - Coenzyme Q10,  $\alpha$ -tocopherol, and oxidative stress could be important metabolic biomarkers of male infertility. *Disease Markers*, **2015** : 827941.

**Haiba F., Kerboua K., Ait Hami N. & Benmahdi L., 2014** - Stress oxydatif et infertilité masculine : premiers résultats de l'expérience algérienne pilote à l' HMRUO/2°RM. *Revue Médicale de l'HMRUO*, No1-2014.

**Hamamah S., Saliba E. & Benahmed M., 1999** - Médecine et biologie de la reproduction: des gamètes à la conception. *Masson*. Montpellier (France), 317p.

**He L. L., Lan F., Xu H. & Wang Yong-Ji., 2015** - Vitamin D3 and Male Reproduction. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, **46(5)** : 334-40.

**Holick M.F., 2007** - Vitamin D deficiency. *The New England Journal of Medicine*, **357(3)** : 266-281.

**Huang Y. L., Tseng W. C., Cheng S. Y. & Lin T. H., 2000** - Trace Elements and Lipid Peroxidation in Human Seminal Plasma. *Biological Trace Element Research*, **76(3)** : 207-15.

**Janero D. R., 1990** - Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine*, **9(6)** : 515-40.



**Juyena N. S. & Stelletta C., 2012** - Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*, **33(4)** : 536-51.

**Kand'ár R., Drábková P. & Hampl R., 2011** - The determination of ascorbic acid and uric acid in human seminal plasma using an HPLC with UV detection. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **879(26)** : 2834-2839.

**Kasperczyk A., Dobrakowski M., Horak S., Zalejska-Fiolka J. & Birkner E., 2015** - The influence of macro and trace elements on sperm quality. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **30** : 153-159.

**Kirichok Y., Navarro B. & Clapham D. E., 2006** - Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sub>2</sub>p channel. *Nature*, **439 (7077)** :737-740.

**Ko E. Y., Sabanegh E. S. Jr & Agarwal A., 2014** - Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertility and Sterility*, **102(6)** : 1518-27.

**Kwenang A., Kroos M. J., Koster J. F. & Van Eijk H. G., 1987** - Iron, ferritin and copper in seminal plasma. *Human Reproduction*, **2(5)** : 387-388.

**Kwon W. S., Park Y. J., el-SA M. & Pang M.G., 2013** - Voltage-dependent anion channels are a key factor of male fertility. *Fertility and Sterility*, **99(2)** : 354-61.

**Landrier J.F. (2014).** - Vitamine D : sources, métabolisme et mécanismes d'action. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, **49(6)** : 245-251.

**Lansac J. & Guérif F., 2005** - AMP: l'assistance médicale à la procréation en pratique. Elsevier/Masson. Paris (France), 602 p.

**Laudat A., Lecourbe K. & Palluel A. M., 1999** - Peroxydation lipidique, profil morphologique de stress testiculaire et maturité nucléaire des spermatozoïdes. *Annales de Biologie Clinique*, **57(1)** : 51-56.

**Leridon H., 1982** - Stérilité, hypofertilité et infécondité en France. *Population*, **37(4)** : 807-836.

**Lewis S. E., Sterling E. S., Young I. S. & Thompson W., 1997** - Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, **67(1)** : 142-147.

**Li K., Shang X. & Chen Y., 2004** - High-performance liquid chromatographic detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its application to male infertility. *Clinica Chimica Acta*, **346(2)** : 199-203.

**Mahanta R., Gogoi A., Chaudhury P. N. B., Roy S., Bhattacharyya I. K. & Sharma P., 2012** - Association of Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Enzymatic Activity in Male Infertility of North-East India. *Journal of Obstetrics and Gynaecology of India*, **62(5)** : 546-550.

**Mahfouz R., Sharma R., Sharma D., Sabanegh E. & Agarwal A., 2009** - Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertility and Sterility*, **91(3)** : 805-811

**Marín-Briggiler C. I., Gonzalez-Echeverría F., Buffone M., Calamera J. C., Tezón J. G. & Vazquez-Levin M. H., 2003** - Calcium requirements for human sperm function in vitro. *Fertility and Sterility*, **79(6)** : 1396-1403.

**Martins A. D., Bernardino R. L., Neuhaus-Oliveira A., Sousa M., Sá R., Alves M. G. & Oliveira P. F., 2014** - Physiology of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers in the Male Reproductive Tract: Relevance for Male Fertility. *Biology of Reproduction*, **91(1)** :11.

**Marzec-Wróblewska U., Kamiński P., Łakota P., Szymański M., Wasilow K., Ludwikowski G., Kuligowska-Prusińska M., Odrowąż-Sypniewska G., Stuczyński T. & Michałkiewicz J., 2011** - Zinc and Iron Concentration and SOD Activity in Human Semen and Seminal Plasma. *Biological Trace Element Research*, **143(1)** : 167-77.

**Marzec-Wróblewska U., Kamiński P., Łakota P., Szymański M., Wasilow K., Ludwikowski G., Kuligowska-Prusińska M., Odrowąż-Sypniewska G., Stuczyński T. & Woźniak A., 2015** - The employment of IVF techniques for establishment of sodium, copper and selenium impact upon human sperm quality. *Reproduction, Fertility and Development*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/RD15041>

**May-Panloup P., Malinge M. C., Larget-Piet L. & Chrétien M. F., 2001** - Infertilité masculine d'origine génétique et assistance médicale à la procréation. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, **29(9)** : 583-93.

**Mc Elreavey K., Krausz C., Patrat C. & Fellous M., 2002** - Infertilité masculine et les microdélétions du chromosome Y. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, **30(5)** : 405-412.

**Merdassi G., Elloumi H., Kdous M., Zhioua F. & Zhioua A., 2011** - Intérêt du prélèvement testiculaire synchrone pour une azoospermie non obstructive à FSH très élevée. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, **26(5-6)** : 264-266.

**Moslemi M. K. & Tavanbakhsh S., 2011** - Selenium–vitamin E supplementation in infertile men effects on semen parameters and pregnancy rate. *International Journal of General Medicine*, **4** : 99-104.

**Niang L., Ndoye M., Labou I., Jalloh M., Kane R. , Diaw J. J., Ndiaye A. & Guèye S. M., 2009** - Profil épidémiologique et clinique de l'infertilité masculine à l'hôpital général de Grand-Yoff, Sénégal: à propos de 492 cas. *Basic and Clinical Andrology*, **19** : 103-107.

**Nourashrafeddin S., 2015** - Potential roles of gonadotropins to control pulsatile retinoic acid signaling during spermatogenesis. *Medical Hypotheses*, **85(3)** : 303-304.

**Nouri M., Ghasemzadeh A., Farzadi L., Shahnazi V. & Novin M. G., 2008** - Vitamins C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of asthenoteratozoospermic and normozoospermic men. *Iran J Reprod Med*, **6**:1-5.

**Organisation mondiale de la santé (OMS), 2010** - Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5<sup>ème</sup> édition, 287p.

**Ouegnin G. A., Gnagne Y. M., Vodi C. C., Faye-Kette H., N'Douba K. A. & Tchetché R. G., 2008** - Epidémiologie Rôle des germes de l'infection génitale dans l'infertilité masculine. *Revue Bio-Africa*. **6** : 32-38

**Owen D. H. & Katz D. F., 2005** - A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of Andrology*, **26(4)** : 459-469.

**Pasqualotto F. F., Sharma R. K., Pasqualotto E. B. & Agarwal A., 2008** - Poor semen quality and ROS-TAC scores in patients with idiopathic infertility. *Urologia Internationalis*, **81(3)** : 263-270.

**Pedron P., Traxer O., Haab F., Farres M. T., Tligui M., Thibault P. & Gattegno B., 1997** - Glandes de Cowper : aspects anatomique, physiologique et pathologique. *Progrès en Urologie*, **7** : 563-569.

**Pons-Rejraji H., Sion B., Saez F., Brugnon F., Janny L. & Grizard G., 2009** - Rôles des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, **37(6)** : 529-535.

**Rao B., Souflir J. C., Martin M. & David G., 1989** - Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Research*, **24(2)** : 127-34.

**Raverdeau M., Gely-Pernot A., Féret B., Denefeld C., Benoit G., Davidson I., Chambon P., Mark M. & Ghyselinck N. B., 2012** - Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109(41)** : 16582-16587.

**Robin G., Boitrellec F., Leroy X., Peers M. C., Marcelli F., Rigot J. M., Mitchell V., 2010** - Bilan d'une azoospermie et évaluation histologique de la spermatogenèse. *Annales de Pathologie*, **30(3)** : 182-195

**Rollet J., 1999** - Biochimie du liquide séminal : Intérêt pour le clinicien. *Andrologie*, **9(4)** : 468-471.

**Rosecrans R. R., Jeyendran R. S., Perez-Pelaez M. & Kennedy W. P., 1987** - Comparison of Biochemical Parameters of Human Blood Serum and Seminal Plasma. *Andrologia*, **19(6)** : 625-628.

**Rousseaux S., Caron C., Pivot-Pajot C., Faure A. K., Hazzouri M., Sele B. & Khochbin S., 2003** - Facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine au cours de la spermiogenèse. *Andrologie*, **13(2)** : 139-147

**Ruskova S., Hlebarova M., Danev S. & Karakasheva V., 1972** - Biochemical and morphological studies of the semen from males with diseases of the reproductive system. *Andrologie*, **4(1)** : 17-24.

- Russell J. M., 2000** - Sodium-Potassium-Chloride Cotransport. *Physiological Reviews*, **80(1)** : 211-76.
- Sakandé J., Kabré E., Ekue-Ligan A., Ouédraogo H. A. & S. M., 2012** - Relation entre les anomalies du spermogramme et les constituants biochimiques du liquide séminal de sujets consultant pour hypofertilité masculine à Ouagadougou. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **6(3)** : 1167-1178.
- Schill W-B, Miesusset R., Comhaire F., Hargreave T., 2008** - Traité d'andrologie à l'usage des cliniciens. Springer. France, 675p.
- Sendi H. S., Ajina M., Lahouel M. A., Khairi H. & Saad A. E., 1994** - Etats épididymaire, prostatique et vésiculaire en relation avec les paramètres du spermogramme chez les hommes consultant pour infertilité. *Andrologie*, **4(4)** : 451-458.
- Sepaniak S., Forges T. & Monnier-Barbarino P., 2005** - Conséquences du tabac sur la fertilité masculine. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, **34** : 102-111.
- Sharma R. K. & Agarwal A., 1996** - Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, **48(6)** : 835-50.
- Shiva M., Gautam A. K., Verma Y., Shivgotra V., Doshi H. & Kumar S., 2011** - Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clinical Biochemistry*, **44(4)** : 319-24.
- Shukla K. K., Mahdi A. A. & Rajender S., 2012** - Ion channels in sperm physiology and male fertility and infertility. *Journal of Andrology*, **33(5)** : 777-88.
- Simoni M., Weinbauer G.F., Gromoll J. & Nieschlag E., 1999** - Role of FSH in male gonadal function. *Annales d'Endocrinologie*, **60(2)** : 102-6.
- Smith L. B. & Walker W. H., 2014** - The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **30** : 2-13.

**Stookey L.L., 1970** - Ferrozine a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*, **42** : 779-781.

**Suleiman S.A., Ali M.E., Zaki Z.M., El-Malik E.M., Nasr M.A., 1996** - Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *Journal of andrology*, **17(5)** : 530-537.

**Sun W., Chen L., Zhang W., Wang R., Goltzman D. & Miao D., 2015** - Active vitamin D deficiency mediated by extracellular calcium and phosphorus results in male infertility in young mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **308(1)** : E51-62.

**Sundaram V., Srinivas M., Gurunathan J., Rao K., Maniyan R. P. & Balasundaram S., 2013** - Influence of trace elements and their correlation with semen quality in fertile and infertile subjects. *Turkish Journal of Medical Sciences*, **43** : 1000-1007

**Therond P., 2006** - Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **64(6)** : 383-9.

**Thérond P., Auger J., Legrand A. & Jouannet P., 1996** - Alpha-Tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma : relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Molecular Human Reproduction*, **2(10)** : 739-744.

**Thonneau P., Marchand S., Tallec A., Ferial M. L., Ducot B., Lansac J., Lopes P., Tabaste J. M. & Spira A., 1991** - Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988–1989)\*. *Human Reproduction*, **6(6)** : 811-816.

**Torres-Flores V., García-Sánchez N. L. & González-Martínez M. T., 2008** - Intracellular sodium increase induced by external calcium removal in human sperm. *Journal of andrology*, **29(1)** : 63-9.

**Traoré M., Touré A., Sissoko S. & Samaké N. F., 2008** - Profil spermiologique des hommes infertiles au Mali. *Andrologie*, **18(4)** : 253-257.

**Travers A., Arkoun B., Safsaf A., Milazzo J. P., Absyte A., Bironneau A., Perdrix A., Sibert L., Macé B., Cauliez B. & Rives N., 2013** - Effects of vitamin A on in vitro maturation of pre-pubertal mouse spermatogonial stem cells. *PLoS One*. **8(12)** : e82819.

**Trifiletti R. R., 2014** - Vitamin D. *Encyclopedia of the Neurological Sciences* (Second Edition). Robert Daroff, Michael J. Aminoff, pp 719-720.

**Umeyama T., Ishikawa H., Takeshima H., Yoshii S. & Koiso K., 1986** - A comparative study of seminal trace elements in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, **46(3)** : 494-499.

**Vijayprasad S., Bb G. & Bb N., 2014** - Effect of vitamin C on male fertility in rats subjected to forced swimming stress. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, **8(7)** : HC05-8.

**Wertheimer E. V., Salicioni A. M., Liu W., Trevino C. L., Chavez J., Hernández-González E. O., Darszon A. & Visconti P. E., 2008** - Chloride Is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, **283(51)** : 35539-35550.

**Wong W. Y., Flik G., Groenen P. M., Swinkels D. W., Thomas C. M., Copius-Peereboom J. H., Merkus H. M. & Steegers-Theunissen R. P., 2001** - The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reproductive Toxicology*, **15(2)** : 131-136.

**Wong W. Y., Merkus H. M., Thomas C. M., Menkveld R., Zielhuis G. A. & Steegers-Theunissen R. P., 2002** - Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertility and Sterility*, **77(3)** : 491-498.

**Wright C., Milne S. & Leeson H., 2014** - Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, **28(6)** : 684-703.

**Xu B., Chia S. E., Tsakok M. & Ong C. N., 1993** - Trace elements in blood and seminal plasma and their relationship to sperm quality. *Reproductive Toxicology*, **7(6)** : 613-618.

**Xu C., Marino L. & Pitteloud N., 2015** - Hypogonadisme chez l'homme. *Forum médical Suisse*, **15(10)** : 218-224.

**Zegers-Hochschild F., Adamson G. D., De Mouzon J., Ishihara O., Mansour R., Nygren K., Sullivan E. & Vanderpoel S., 2009** - International Committee for Monitoring Assisted

Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertility and Sterility*, **92(1)** : 1520-1524.

**Zheng L. P., Wang H. F., Li B. M. & Zeng X. H., 2013** - Sperm-specific ion channel : targets holding the most potential for male contraceptives in development. *Contraception*, **88(4)** : 485-491.

**Zirkin B. R., 1998** - Spermatogenesis : its regulation by testosterone and FSH. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **9(4)** : 417-421.

**Zorn J. R. & Savale M., 2005** - Stérilité du couple. Elsevier Masson. France, 336 p.



# **ANNEXES**

# **ANNEXE A DES PUBLICATIONS**

# Lipid peroxidation and total antioxidant capacity in azoospermic semen

MARIE-FLORENCE N'GUESSAN<sup>1,2</sup>, FOUNZÉGUÉ AMADOU COULIBALY<sup>2,3</sup>, KONAN KOUASSI, YAYEYAPI GUILLAUME<sup>4</sup>, NOËL COULIBALY<sup>2</sup>, ERIC AYEKOUE<sup>2</sup>, KONAN SYLVÈRE N'ZI<sup>2</sup>, GERVAIS MÉLAINE M'BOH GERVAIS MÉLAINE M'BOH<sup>2</sup>, SOULEYMANE MÉITÉ<sup>2</sup>, HOUPHOUËT FÉLIX YAPI<sup>1</sup>, ALLICO JOSEPH DJAMAN<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Pharmacodynamie biochimique de l'Unité de Formation et de Recherche Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan (Côte d'Ivoire), 22 Bp 522 Abidjan 22; <sup>2</sup>Département de Biochimie clinique et fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) 01 Bp490 Abidjan 01; <sup>3</sup>Service d'Urologie du Centre Hospitalier Universitaire de Treichville, Abidjan (Côte d'Ivoire) 01 Bp V3 Abidjan 01; <sup>4</sup>Unité Pédagogique Biochimie-Microbiologie de l'Unité de Formation et de Recherche Agroforesterie, Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa (Côte d'Ivoire), Bp 150 Daloa.

Received 13 February 2016

Accepted 11 April 2016

## Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are produced naturally in the male reproductive system and play many roles in fertility. The presence of moderate concentrations and controlled thereof is essential to hyperactivation process, maturation, capacitation, acrosome reaction of spermatozoa. They also intervene in mobility, fertilization and adhesion of spermatozoa to the oocyte. Oxidative stress is result from the profound imbalance between ROS and antioxidants in favor of first. It is one of major causes of male infertility [1,2]. It induces changes in the plasma membrane and in the nucleus which lead to loss of mobility and which decreased fertilizing capacity of spermatozoa [3-5]. Different methods are used to measure the prooxidant and antioxidant status of semen. Indeed, the malonyldialdehyde (MDA) is reliable biomarker of lipid peroxidation. Its measurement allows the assessment of the prooxidant status [6-8].

Correspondence to: Marie-Florence N'Guessan

Email: millo2@yahoo.fr

## ABSTRACT

**Objective:** This study was carried out to assess identify new biochemical markers of azoospermia based on dosage of malonyldialdehyde and of total antioxidant capacity.

**Methods:** The assay of MDA and TAC were carried out in the seminal plasma of 30 azoospermics and 30 normozoospermics. Normospermics served as the control group.

**Results:** The average concentration of MDA in the seminal plasma of azoospermics was  $16.86 \pm 1,347 \mu\text{M}$  and for normospermics was  $17.88 \pm 1.615 \mu\text{M}$ . They showed no significant difference with  $P > 0.05$ . The TAC of azoospermic was  $2091 \pm 88.93 \mu\text{M}$  and for normozoospermics the concentration was  $1410 \pm 196.7 \mu\text{M}$ . The concentration of the TAC, demonstrated a significant difference with  $P < 0.05$ .

**Conclusion:** MDA in the seminal plasma presents no diagnostic value for azoospermia. However, the TAC is very high in azoospermics. Its evaluation may prove essential in the diagnosis of azoospermia.

## KEY WORDS:

Azoospermia  
Malonyldialdehyde  
Normozoospermia  
Seminal plasma  
Total antioxidant capacity

This marker is correlated to degree of alteration of spermatozoa function [9]. It results from the degradation of hydroperoxides formed during the peroxidation of polyunsaturated fatty acids. Lipid peroxidation is a process of bioactive chain reactions due to the oxidation of polyunsaturated lipids in the presence of oxygen [10]. It leads to the formation of primary products such as hydroperoxides or secondary products final such as MDA, 4-hydroxynonenal (4-HNE) and isoprostanes [6]. Moreover, semen contains many antioxidant substances to fight against oxidative stress [11]. Some are present in the spermatozoa, but the seminal plasma, is the best protection [12,13]. It contains

antioxidants of two types: enzymatic antioxidants (superoxide dismutase, glutathione, catalase) and those non-enzymatic, such as ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, uric acid, albumin, carnitine, carotenoids, flavonoids and coenzyme Q10 [14, 15]. The determination of the total antioxidant activity (TAC) enables to explore the antioxidant status of semen. It determines the sperm's ability to neutralize ROS [16]. So the low level of the TAC and the high concentration of MDA in the seminal plasma have a key role in male infertility. In view of the action of oxidative stress markers in maintaining semen quality, assessment of oxidative stress status in seminal plasma of azoospermics could serve of tool azoospermia diagnostic. Azoospermia is a male infertility that affects less than 1% of men in the general population, being 5-15% of infertile men. It is characterized by the absence of spermatozoa in the ejaculate. Diagnosis is formal when no spermatozoon is found after centrifugation of the whole ejaculate to ensure that it no contains very few spermatozoa [17]. It is so important to develop reliable biochemical methods for the diagnosis of azoospermia. The objective of this study is to determine firstly MDA and TAC concentration in azoospermics seminal plasma and secondly to establish the relationship between thereof and azoospermia.

## Materials and methods

The study was conducted at the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire (IPCI). The semen samples were collected with the patients consents in accordance to the standards established by the National Ethics and Research Commission of Côte d'Ivoire (NIRB-CI); Order No. 36/MLS/NIRB/TB. Sixty samples of normozoospermic and azoospermic semen of men were selected for this study. Normozoospermics semen samples were considered the control group.

## Inclusion criteria

Only men with azoospermia and normozoospermia after realization of their spermogram and respecting conditions semen collections were included in this study

## Exclusion criteria

The exclusions criteria have permitted to reject all people who have not observe conditions for realization of spermogram and those with leucospermia and hyperviscosity.

## Sample analysis

### Realization of spermogram

The semen collection was done by masturbation after three days of abstinence. The semen analysis was performed according to the standards of the World Health Organization (WHO) [18]. After collection, semen samples were liquefied at a temperature of 37 °C in an incubator for one hour and then used for analysis. Macroscopic examination of the semen was performed to determine the color, volume, pH and viscosity of samples. Concentration, motility, morphology of spermatozoa was assessed by microscopic examination.

For the biochemical analysis of semen collected, samples were centrifuged at 3000 tr/mn for 10 minutes and seminal plasma was collected and stored at -8°C until the day of the analysis.

Thereafter samples were thawed at room temperature, and then 100  $\mu$ l of seminal plasma was diluted with 900  $\mu$ l of distilled water. This dilution was used immediately for the assay of MDA and TAC.

### MDA assay

It was evaluated using the method of determination of thio barbituric acid reactive substances (TBARS) described by Rao et al. [19]. To 1 ml of diluted seminal plasma was added 500  $\mu$ l of thiobarbituric acid reagent, (consisting of 0.67 g of 2-thiobarbituric acid dissolved in 100 ml of distilled water with 0.5 g NaOH and 100 ml of glacial acetic acid) then the assembly was heated for 1 hour in a boiling water bath at 100° C. After cooling to room temperature, each tube was centrifuged for 10 minutes at 4000 trs / min, and the absorbance of the supernatant was read with a spectrophotometer at 534 nm. The calibration solution was prepared from of 1,1,3,3\_tétraméthoxypropane (TMP) at 0.01%.

### TAC assay

It was performed using the method of iron reduction; ferric reducing antioxidant power (FRAP) described by Benzie and Strain [20]. The FRAP reagent was prepared in the proportions 10/1/1 by mixing buffer solution sodium acetate at 300 mM, pH 3.6; a solution of 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ) at 10 mM and a solution of 20 mM of FeCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O. Then 1.5 mL of FRAP reagent was placed in glass tubes and then maintained at 37 ° C in water bath for 5 minutes. 50  $\mu$ l of diluted seminal plasma was added to the FRAP

reagent and maintained at 37 ° C in water bath for 10 minutes. Then the absorbance is read at 593 nm. The calibration range was made from a stock solution of FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O at 100 μM.

### Statistical analysis

The obtained data was analyzed using Graph Pad Prism 5.0 software. The results are summarized as arithmetic mean values and standard deviation (SD). The differences between the mean values of MDA and TAC in seminal plasma of azoospermics and normozoospermics were analyzed for statistical significance by student T-test (Nonparametric tests) and Mann–Whitney U test. Probability level values at  $P < 0.05$  were regarded as significant.

### Results

The study included 30 normozoospermics and 30 azoospermics according to WHO criteria. The average age of azoospermics group was 39 (range 23 - 45) years. While the control group had an average age of 39 years with a 26 - 45-year interval. The data obtained from the spermogram analysis of azoospermics group and controls are shown in table 1.

**Table 1.** Azoospermics and normozoospermics semen characteristics.

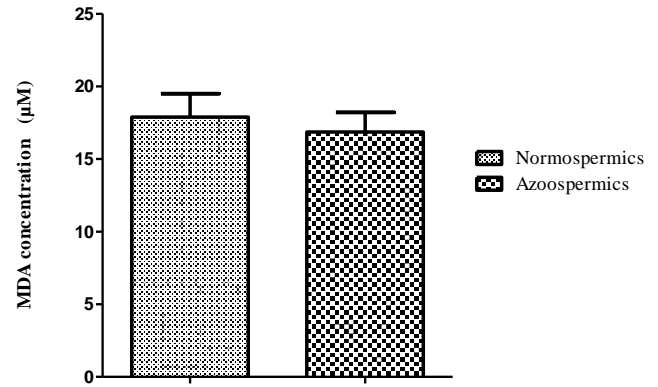
Semen characteristics	Normozoospermic	Azoospermic
n	30	30
Volume (ml)	3.42 ± 0.24	2.96 ± 0.25
pH	7.58 ± 0.05	7.61 ± 0.04
Concentration (10 <sup>6</sup> /ml)	68.88 ± 6.74	00 ± 00
Mobility 1H (a+b) (%)	47.20 ± 1.53	00 ± 00
Mobility 4H (a+b) (%)	31.20 ± 1.48	00 ± 00
Morphology (%)	23.52 ± 1.82	00 ± 00

Comparison of the MDA levels in the seminal plasma of the two groups is shown in figure 1. The mean concentration of MDA among two groups was not significantly different; with a  $P$ -value of 0.684 ( $P > 0.05$ ) (figure 1).

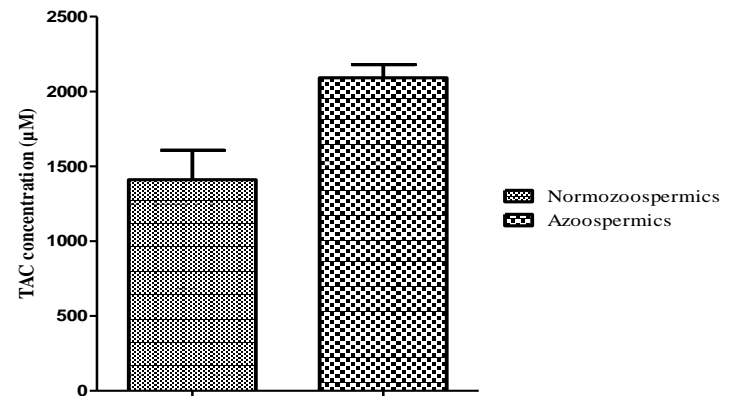
The mean value of MDA in seminal plasma of normozoospermics was  $17.88 \pm 1.615 \mu\text{M}$  and that of azoospermics was  $16.86 \pm 1.347 \mu\text{M}$ . TAC of azoospermics was 1.5 times

higher than that of normozoospermics. The mean concentration of normozoospermics TAC ( $1410 \pm 196.7 \mu\text{M}$ ) was significantly lower than that of azoospermics ( $2091 \pm 88.93 \mu\text{M}$ ) with a  $P$ -value of 0.0002 (figure 2).

**Figure 1.** Comparison of mean (SD) value of seminal plasma MDA level among groups.



**Figure 2.** Comparison of mean (SD) value of seminal plasma TAC level among groups.



### Discussion

MDA assay in semen is used in biochemical tests to monitor the degree of peroxydative alterations of spermatozoa [21]. The high levels of MDA concentration in seminal plasma represent increased levels of lipid peroxidation which lead to decrease fertility [5,21,7]. This is a characteristic of oxidative stress and it shows an imbalance of the balance between ROS and antioxidants [1-3]. Lipid peroxidation was highlighted in the plasma membrane of spermatozoa as reported by several authors [8,22]. It is responsible for the reduction in membrane fluidity, aggregation and rearrangement of the phospholipid bilayer [10]. Shiva *et al.*, as well as Abdul-Rasheed, showed a significant increase of MDA concentration in azoospermic semen com-

pared to normozoospermic [8,14]. Abdul-Rasheed concluded that azoospermia, oligozoospermia and asthenozoospermia are associated with an increase of MDA concentration in the seminal plasma [8]. Similarly, Huang *et al.* indicated that the concentration of MDA in normozoospermics semen is significantly lower than that of asthenozoospermic and oligoasthenozoospermic semen [22]. Li *et al.*, reported a significant difference in MDA concentration in seminal plasma only between non-obstructive azoospermia and normozoospermia [23]. For Pasqualotto and *al.*, MDA concentration in semen is negatively associated to ROS except idiopathic infertility [24]. However, the concentration of MDA in seminal plasma of normozoospermics and azoospermics evaluated in this study show no significant difference. Also according to our study, MDA cannot be used as biochemical diagnostic marker of azoospermia. Haiba *et al.* have shown that the concentration level of MDA in seminal plasma is not correlated to the concentration and motility of spermatozoa [25]. The presence of MDA concentration in seminal plasma of azoospermic semen cannot to express the lipid peroxidation of spermatozoa, owing to the absence of spermatozoa. The results of Huang *et al.* suggested that the MDA concentration in seminal plasma is not all derived from the spermatozoa, but it may also in part have its origin in lipid peroxidation occurring in the prostate, seminal vesicles, and other accessory organs [22]. MDA formation is not specific of lipids. It may be formed upon activation of the cyclooxygenase pathways, and appear during the interaction of the hydroxyl radical with vitamin C or with deoxyglucose [26].

TAC of seminal plasma enables to appreciate its ability to neutralize free radicals. It assesses the cumulative effect of all antioxidants present in seminal plasma, but without individualizing them [16,27]. Seminal plasma contains many antioxidants that act as scavengers of free radicals. They ensure the protection of spermatozoa against oxidative stress [12,13,15]. The low TAC level has a key role in male infertility [27]. It is generally related to a deficiency in antioxidant influenced by several factors such as nutrition, age, infection, hormones [28]. This study showed that the value of the total antioxidant capacity in azoospermic semen was higher relative to that of normozoospermic semen and it had a significant difference. However, it was noted in general that, the seminal plasma of fertile men has a higher total antioxidant capacity than that of infertile men [11,27,29]. Shiva *et al.* have found an average concentration of superoxide dismutase (SOD) significantly lowered

in the seminal plasma of azoospermic semen [14]. For catalase and ascorbic acid, they found no significant difference between the concentrations in normozoospermic and azoospermic semen [14]. Mahfouz *et al.* have described a level of TAC of 1420  $\mu\text{M}$  from which we can define fertile semen [27]. Whereas the average concentration of the TAC in our study was 1410  $\mu\text{M}$ . The results of this study show that the antioxidant activity is not deficit in azoospermics and TAC can serve as a selective biochemical marker of azoospermia. It distinctly shows that azoospermia is associated with increase in seminal plasma antioxidant level. These results can be explained by the fact that in semen, the antioxidants production is expressed in several male reproductive tract tissues, including testis, epididymis, prostate, and seminal vesicles; it is possible that antioxidant expression in these tissues is upregulated in response to defective spermatogenesis. This assumption is similar to that emitted by Kumar *et al.* and Zini *et al.* [30,31]. But also the antioxidants present in seminal plasma are essential for maintaining male fertility but the excess of these may also cause the reverse effect [32]. These results support the idea that high levels of ROS detected in some cases of male infertility are mainly due to their excessive production and not to a failure of the antioxidant activity of seminal plasma [33].

The study of evaluation of oxidative stress in seminal plasma of azoospermics has considered lipid peroxidation and total antioxidant activity. The concentration of MDA in the seminal plasma of azoospermics and that of normozoospermics did not show a significant difference, this parameter cannot be used as a biochemical marker of azoospermia. Therefore, lipid peroxidation is not the only source of production of MDA in the seminal plasma. On the other hand, total antioxidant activity of azoospermics has showed a significant difference compared to normozoospermics. Therefore, TAC could serve as a biochemical marker for diagnosis of azoospermia.

### Conflict of Interest

We declare that we have no conflict of interest.

### Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to Programme d'Appui Stratégique à la Recherche Scientifique (PASRES) for support financial. They thank Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) for technical support.

## References

- 1 De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997;2: 48–54.
- 2 Sharma R.K. and Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 1996;48(6):835-50.
- 3 Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ Jr, Alvarez JG, Sikka SC. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril*. 2006;86(4):878-885.
- 4 Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod*. 2011;26(7):1628–1640.
- 5 Laudat A, Lecourbe K, Palluel AM. Peroxydation lipidique, profil morphologique de stress testiculaire et maturité nucléaire des spermatozoïdes. *Ann Biol Clin*. 1999; 57:51-6.
- 6 Chari MG, Colagar AH Seminal plasma lipid peroxidation, total antioxidant capacity, and cigarette smoking in asthenoteratospermic. *J Mens Health*. 2011;8(1):43-49.
- 7 Ko EY, Sabanegh ES Jr, Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1518-1527.
- 8 Huang YL, Tseng WC, Cheng SY, Lin TH. Trace Elements and Lipid Peroxidation in Human Seminal Plasma. *Biol Trace Elem Res*. 2000;76(3):207-15.
- 9 Therond P. Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Ann Pharm Fr*. 2006; 64(6):383–389.
- 10 Camejo MI, Segnini A, Proverbio F. Interleukin-6 (IL-6) in seminal plasma of infertile men, and lipid peroxidation of their sperm. *Arch Androl*. 2001;47(2):97-101.
- 11 Abdul-Rasheed OF Association between seminal plasma copper and magnesium levels with oxidative stress in iraqi infertile men. *Oman Med J*. 2010;25(3):168-72.
- 12 Li K, Shang X, Chen Y. High-performance liquid chromatographic detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its application to male infertility. *Clin Chim Acta*. 2004;346(2):199-203.
- 13 Ali HB, Atig F, Mehri S, Saad A, Ajina M. Analyse du statut oxydatif spermatique chez des patients infertiles. *Andrologie*. 2012;22(4):233-240.
- 14 Alvarez JG, Storey BT. Differential Incorporation of Fatty Acids Into and Peroxidative Loss of Fatty Acids From Phospholipids of Human Spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 1995; 42:334-346.
- 15 Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 1997;67(1):142-7.
- 16 Kandár R, Drábková P, Hampl R. The determination of ascorbic acid and uric acid in human seminal plasma using an HPLC with UV detection. *J Chromatogr B Technol Biomed Life Sc.i*. 2011;879:2834- 2839.
- 17 Nouri M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, Shahnazi V, Novin M G Vitamins C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of asthenoteratozoospermic and normozoospermic men. *Iran J Reprod Med*. 2008;6(1):1-5.
- 18 Shiva M, Gautam AK, Verma Y, Shivgotra V, Doshi H, Kumar S. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clin Biochem*. 2011;44:319–324.
- 19 Giannattasio A, De Rosa M, Smeraglia R, Zarrilli S, Cimmino A, Di Rosario B, et al. Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. *J Endocrinol Invest*. 2002;25: 983-6.
- 20 Coat C., Perrin A., Talagas M., Tetefort R., Amice J., Valéri A., et al. Azoospermie : prise en charge et résultats. À propos de 90 cas. *Prog Urol*. 2011;21(13):946-954.
- 21 Organisation mondiale de la santé (OMS). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010; 5th edit. p 249.
- 22 Rao B, Souflir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res*. 1989;24:127–34.
- 23 Benzie IFF, Strain JJ The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘‘Antioxidant Power’’: The FRAP Assay. *Anal Biochem*. 1996; 239:70–76.
- 24 Pasqualotto FF, Sharma RK, Pasqualotto EB, Agarwal A. Poor semen quality and ROS-TAC scores in patients with idiopathic infertility. *Urol Int*. 2008; 81:263-70.
- 25 Haiba F., Kerboua K., Ait Hami N., Benmahdi L. Stress oxydatif et infertilité masculine: premiers résultats de l’expérience algérienne pilote à l’HMRUO/2°RM. *Revue Médicale de l’HMRUO*, No1-2014.
- 26 Janero DR Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 1990; 9:515–40.
- 27 Mahfouz R, Sharma R, Sharma D, Sabanegh E, Agarwal A. Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma *Fertil Steril*. 2009;91(3):805-11
- 28 Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS+ radical cation assay. *Free Radic Res* 1997; 26:195–9.
- 29 Benedetti S, Tagliamonte MC, Catalani S, Primiterra M, Canestrari F, De Stefani S, et al. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reprod Biomed Online* 2012; 25:300– 306
- 30 Kumar D, Salian SR, Kalthur G, Uppangala S, Kumari S, Challapalli S, et al. Association between sperm DNA integrity and seminal plasma antioxidant levels in health workers occupationally exposed to ionizing radiation. *Environ Res*. 2014;132:297-304.

- 31 Zini A, Garrels K, Phang D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology*. 2000;55 (6):922-6.
- 32 Faure C, Dupont C, Sermondade N, Lévy R, Antioxydants et infertilité masculine mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie. *Endocrinologie*. 2011;13(4):275-83.
- 33 Hammadeh ME, Radwan M, Al-Hasani S, Micu R, Rosenbaum P, Lorenz M, Schmidt W Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and nonpregnant patients after IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2006;13(5):696–706.



## **Evaluation of minerals in the seminal plasma of azoospermic semen**

**Marie-Florence N'Guessan**<sup>1,2,\*</sup>, Yapi Guillaume Yaye<sup>4</sup>, Founzégué Amadou Coulibaly<sup>1,2</sup>, Eric Ayekoue<sup>1,2</sup>, Konan Sylvère N' Zi<sup>1,2</sup>, Noël Coulibaly<sup>3</sup>, Gervais Méline M'Boh<sup>2</sup>, Souleymane Méité<sup>2</sup>, Yapi Félix Houphouët<sup>1</sup> and Allico Joseph Djaman<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Pharmacodynamie biochimique de l'Unité de Formation et de Recherche Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan (Côte d'Ivoire), 22 Bp 522 Abidjan 22

<sup>2</sup>Département de Biochimie clinique et fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) 01Bp490 Abidjan 01

<sup>3</sup>Service d'Urologie du Centre Hospitalier Universitaire de Treichville, Abidjan (Côte d'Ivoire) 01Bp V 3 Abidjan 01

<sup>4</sup>Unité Pédagogique Biochimie-Microbiologie de l'Unité de Formation et de Recherche Agroforesterie, Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa (Côte d'Ivoire), Bp 150 Daloa.

### **\*Correspondence Info:**

Marie-Florence N'Guessan,

Laboratoire de Pharmacodynamie biochimique de l'Unité de Formation et de Recherche Biosciences de l'Université Félix Houphouët Boigny-Abidjan (Côte d'Ivoire)

E-mail: [miflo2@yahoo.fr](mailto:miflo2@yahoo.fr)

### **Abstract**

**Background:** Seminal plasma is largely variety of compounds which reflect the functioning of the male genital tract. However, only citrate, zinc, fructose, alpha-glucosidase, and L-carnitine based on their concentration level are used to explore azoospermia state. Other constituents of seminal plasma should also be the subject of a study for the identification of new specific markers azoospermia. Several studies have reported that the minerals involved in maintenance and function of male fertility.

**Aim:** Assay of sodium, potassium, calcium, magnesium, phosphorus, chlorine and iron is designed to identify new biochemical markers of azoospermia.

**Material and Methods:** Analysis of seminal plasma was carried out with 30 samples of normozoospermic semen and 30 samples of azoospermic semen. The assay of calcium, phosphorus, magnesium and iron was done using the automated Cobas<sup>®</sup> c311 de Roche/Hitachi. The evaluation of the concentration level of chlorine, sodium and potassium in the seminal plasma was performed using the automated Roche<sup>®</sup> 9180 Electrolyte Analyser. The data collected were analyzed using the software Graph Pad Prism 5. *P*- values less than 0.05 was considered the level of significance.

**Results:** The results of this study showed that the correlation test performed between concentrations level of minerals in the seminal plasma of normozoospermic and azoospermic semen showed no significant difference statistically with *P* > 0.05.

**Conclusion:** Absence of spermatozoa in the semen does not affect her osmolality. Thus sodium, potassium, calcium, magnesium, phosphorus, chlorine and iron have no diagnostic value for the male reproductive system disorders, including azoospermia.

**Keywords:** Azoospermia, Normozoospermia, Seminal plasma, Mineral elements

### **1. Introduction**

Azoospermia is a complete absence of sperm in the semen. Its investigation is performed through the clinical examination, additional tests of biology and medical imaging [1]. Seminal biochemistry is part of biological exploration tests of azoospermia. It determines the concentration of biochemical markers in seminal plasma to specify the level and the topography of an obstruction in azoospermia. It provides information only on type of azoospermia : secretory or excretory [2]. The seminal plasma is an important indicator of semen quality and monitoring of male infertility [2]. It contains variety of compounds that reflect the functional state of the male genital tract. However only citrate, zinc, fructose,

alpha-glucosidase and L-carnitine based on their concentration level used to study the functional state of the accessory glands. They are called the seminal plasma markers [3]. The other compounds of the seminal plasma should also be investigated in order to identify new specific markers of azoospermia.

Minerals are essential for the performance of vital biological functions [4]. They are divided into two groups: macronutrients and trace elements. In the cell, they are involved not only in the stable of osmotic pressure but also as the catalyst of several biochemical reactions [5]. Several studies done have helped to identify them in seminal plasma

[6-8]. They intervene in the maintenance of male fertility [9]. Semen quality is correlated to the concentration level of some of minerals and their presence reflects satisfactorily the functional state of accessory gland of the male genital tract [5, 10-13]. They are used in treatment and prevention of infertility [9]. They are essential in the regulation of the acrosome reaction, spermatozoa capacitation and spermatozoa motility [14, 15]. They may serve as tools to support the assessment of male infertility [16].

In view of their involvement in maintaining male fertility, mineral elements such as sodium, potassium, calcium, magnesium, phosphorus, chlorine and iron present in seminal plasma may be a subject to an investigation to identify new biochemical markers of azoospermia exploration. Analysis of these minerals in the seminal plasma of azoospermics and normozoospermics has for objective to determine their concentration levels on one hand and to define the relationship between minerals and azoospermia on the other hand.

## 2. Material and methods

The study was conducted at the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire (IPCI). The semen samples were collected with the consent of patients in accordance to the standards of the National Ethics and Research Commission of Côte d'Ivoire (NIRB-CI); Order No. 36 / MLS / NIRB / TB.

Sixty samples of semen normozoospermic and azoospermic of men were selected for this study. Normozoospermics semen samples were considered the control group.

**2.1 Inclusion criteria:** Only men with azoospermia and normozoospermia after realization of their spermogram and respecting conditions semen collections were included in this study.

**2.2 Exclusion criteria:** The exclusions criteria were rejecting all people who have not observed the conditions for spermogram realization and those with leucospermia and hyperviscosity.

### 2.3 Sample Analysis

**2.3.1 Realization of spermogram:** The semen collection was obtained through masturbation after three days of abstinence. The semen analysis was performed according to the standards of the World Health Organization (WHO) [17]. After collection, semen samples were liquefied at a temperature of 37<sup>0</sup> C in an incubator for one hour and then used for analysis.

Macroscopic examination of the semen was used to determine the color, volume, pH and viscosity of samples. Concentration, motility, morphology of spermatozoa was assessed by microscopic examination.

For the biochemical analysis of semen collected, samples were centrifuged at 3000 tr/mn for 10 minutes and seminal plasma was collected and stored at -8°C until the day of the analysis.

**2.3.2 Dosage of chlorine, sodium and potassium:** It was made from the dilution of 100 µl of seminal plasma to 1 / 5th. Different assays have been made from the method of ion-selective electrode using the analyzer Roche® 9180 Electrolyte Analyser.

**2.3.3 The dosage of calcium, inorganic phosphate, magnesium and iron:** It was made by the Cobas® c311 de Roche/Hitachi analyser which is a selective multi-parameter analyzer for the analysis of classical biochemistry and immunoassay in homogeneous phase. The dosage of ions calcium is made by the method of Schwarzenbach with o-cresolphthalein complexon. The method used for the determination of inorganic phosphorus has been the one phosphomolybdate direct according to Daly and Ertingshausen. The dosage of iron was produced from the method of Guanidine / FerroZine. For magnesium assay, the colorimetric method using Chlorophosphonazo III was used.

### 2.4 Statistical Evaluation

The obtained data was analyzed by using software Graph Pad Prism 5.0. The results are summarized as arithmetic mean values and standard deviation (SD). The differences between the mean values of minerals in seminal plasma of azoospermics and normozoospermics were analyzed for statistical significance by student T-test (Nonparametric tests) and Mann-Whitney U test. Probability level values at  $P < 0.05$  were regarded as significant.

## 3. Results

The study included 30 azoospermics and 30 normozoospermics according to WHO criteria. The average age of azoospermics group was 39 (range 23-45) years. While the control group (normozoospermics) had an average age of 39 years with a 26-45 year. Data collected from spermogram of azoospermics and control groups (normozoospermics) are shown in (Table 1). The average values of ion concentration  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{Fe}^{2+}$  in both groups were not statistically significant (Table 2).

**Table 1: Azoospermics and normozoospermics semen characteristics**

Semen characteristics	Normozoospermic	Azoospermic
N	30	30
Volume (ml)	3.42±0.24	2.96±0.25
pH	7.58±0.05	7.61±0.04
Concentration (10 <sup>6</sup> /ml)	68.88±6.74	00±00
Mobility 1H (a+b) (%)	47.20±1.53	00±00
Mobility 4H (a+b) (%)	31.20±1.48	00±00
Morphology (%)	23.52±1.82	00±00

**Table 2: The average concentration of minerals in the seminal plasma of azoospermics and normozoospermics**

Minerals (mg/L)	Normospermics	Azoospermics	P-value	significance
Na <sup>+</sup>	192.8 ± 28.20	189.0 ± 11.66	0.627	NS
K <sup>+</sup>	26.63 ± 8.182	28.41 ± 7.33	0.609	NS
Cl <sup>-</sup>	138.3 ± 9.705	130.8 ± 13.74	0.136	NS
Ca <sup>2+</sup>	194.8 ± 77.21	213.2 ± 49.23	0.588	NS
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	439.1 ± 58.38	417.1 ± 67.71	0.353	NS
Mg <sup>2+</sup>	35.90 ± 19.22	44.27 ± 19.34	0.210	NS
Fe <sup>2+</sup>	5.663 ± 3.40	5.397 ± 2.47	0.877	NS

\* $p < 0.05$  significant

\*NS Not significant

#### 4. Discussion

In this study, the comparison of minerals concentration in seminal plasma of normozoospermics and azoospermics semen was established.

Sodium is the major extracellular cation. In semen, it takes part in exchange between seminal plasma and sperm. It is essential to the intracellular and extracellular pH balance [18, 19]. The average sodium concentration in the seminal plasma of azoospermics, compared to that of normozoospermics is not statistically significant. The sodium cannot be used as a biochemical marker in differentiating azoospermic semen, from those normozoospermic in azoospermia diagnostic. These results are different from those obtained by Sakandé *et al* [6]. They reported a significant difference between the sodium concentration in the seminal plasma of normospermics and those of pathogenic state. For Ruskova *et al* [20], sodium has a limited diagnostic value for male reproductive system disorders. Nevertheless there is a significant correlation between semen characteristics and the sodium concentration in seminal plasma [21].

The osmolality of the extracellular environment has an essential role in regulating spermatozoa metabolism. The extracellular medium is rich in sodium and chlorine while the intracellular medium is rich in potassium and phosphorus. Sodium exchanges between the cell and the external environment are made through protein structures. The sodium enters in the cell through voltage-gated channels and receptor-dependent, exchangers, cotransporter; it goes out through the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump [19,22].

Ion channels of the plasma membrane are the heart of control of spermatozoa function [23]. Indeed, the ion flux through the proteins channel allows a transfer of information between the spermatozoa and their environment [22,23]. Under normal physiological conditions, the spermatozoa membrane potential and intracellular pH are values such that the ion channels remain active at a minimal level. They are potentially activated only in the presence of agonists or physiological stimuli [24]. These different channels are used to maintain constant ion concentration in the extracellular and intracellular environment.

The comparison of potassium concentration in the seminal plasma of normospermics and azoospermics is not significant. Potassium cannot be used as a biochemical marker of differentiation between them as Ruskova *et al*. [20] confirms. Nevertheless, it appears that sodium / potassium ratio in the seminal plasma is important for spermatozoa motility and function [8]. Potassium is the major intracellular cation. It plays a key role in cellular repolarization. The subsequent depolarization at the entrance of sodium and calcium into the cell is followed by repolarization occurring by the potassium efflux. The return of the cell to the initial equilibrium state is provided by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase membrane [25].

The evaluation of the chlorine concentration in the seminal plasma of azoospermics and normozoospermics indicates that it cannot be a differentiating factor. The role of the chloride ion is relatively unknown although it is the main anion balancing the sodium and potassium cations in the extracellular medium [26]. Concerning spermatozoa, chlorine is involved in cellular homeostasis process, spermatogenesis and capacitation [27]. There are proteins involved in the transportation of chloride ions across the plasma membrane [27].

For Briggiler-Marín *et al*. [14], the level of the calcium concentration in seminal plasma is essential because it plays an important role in spermatozoa mobility and capacitation. The results of our studies show that the average concentration of calcium in the seminal plasma of the azoospermics and normozoospermics showed no significant difference. Calcium cannot then act as a biochemical marker for the differentiation of azoospermic and normozoospermic semen as confirmed by the work of Wong *et al*. [5]. The presence or absence of spermatozoa in the semen does not influence the calcium concentration in seminal plasma. Contrary to the study conducted by Sundaram *et al*. [28] who reported that the difference in calcium concentration in seminal plasma of infertile and fertile men has a low level of significance. In semen calcium can be found in three forms: free, complexes or bound to a protein. Only a small portion, from 2% to 4% of calcium in the semen is in ionised form

[29]. Its concentration is higher in spermatozoa than in the seminal plasma. The transport of calcium across the plasma membrane is done by the CatSper channel, in association with other ion channels, Slo3 K<sup>+</sup> channel, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger [22,30]. These channels provide the regulation of cellular homeostasis. The entry of calcium by cation channels (CatSper) is essential for many important physiologically process, such as hyperactivation, chemotaxis and acrosome reaction [22].

Phosphorus is produced mainly in the epididymis [31]. It is involved in the regulation of male fertility [32]. The results of this study showed that the average concentration of phosphorus in the seminal plasma of normozoospermics and azoospermics could not to serve as biochemical marker for the exploration of azoospermia. Adamopoulos and Deliyannis [11] showed in their study that the concentration of inorganic phosphate was higher in semen asthenozoospermic but lower in those azoospermic and normozoospermic. Phosphate is one of the majority anions of the cell where it ensures the electrical neutrality by combining with potassium.

Magnesium is present at a high concentration in semen [7]. It acts as a cofactor for several enzymatic reactions involving energy metabolism (ATP) and nucleic acid synthesis [33]. It plays an important role in spermatogenesis, particularly in spermatozoa motility. The magnesium concentration presents no significant difference in the seminal plasma of normozoospermics and azoospermics as confirmed by the study of Sundaram *et al* [28]. Umeyama *et al* [7] reveal from their work that the magnesium concentration in seminal plasma is almost identical between fertile and infertile men. There is a concentration gradient between the content of free magnesium in the extracellular medium and that of the intracellular medium and an electrical gradient which tend to bring the magnesium in the cell. There are magnesium pumps such as those of calcium and sodium that take out magnesium of the cell and which keep cellular homeostasis [34].

The average concentration of iron in seminal plasma of semen normozoospermics is slightly higher than that of azoospermic semen; however it does not present significant difference. Marzec-Wróblewska *et al.* [35] reported that there is no significant correlation between the iron concentration in the semen of fertile and infertile men. Iron plays an important role in male fertility and spermatogenesis [36]. Iron's ability to serve as both electron donor and acceptor makes it irreplaceable metal for various metabolic and physiological pathways. Indeed, it is a component of many enzymes and metalloprotein. Only a small fraction of iron is in free form, any excess free iron is toxic to the body. In the semen we note the presence of specialized proteins that regulate homeostasis. They are involved in the transportation of iron and its regulation metabolism [37].

## 5. Conclusion

Mineral components such as sodium, potassium, calcium, magnesium, phosphorus, chlorine, and iron, while playing an important role in functioning and maintenance of male fertility, have no diagnostic value for disorders of the male reproductive system, particularly azoospermia. The presence or absence of spermatozoa in the semen does not influence its osmolality. This study highlighted the role of the plasma membrane in maintaining cellular homeostasis.

## Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to Programme d'Appui Stratégique à la Recherche Scientifique (PASRES) for financial support. They thank Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) for technical support.

## References

- [1] Coat C., Perrin A., Talagas M., Tetefort R., Amice J., Valéri, A. De Braekeleer Amice M., V. Azoospermie : prise en charge et résultats. À propos de 90 cas *Progrès en Urologie* 2011; 21(13):946-954.
- [2] Rollet J. Biochimie du liquide seminal: Intérêt pour le clinicien *Andrologie* 1999;9(4):468-471.
- [3] Sendi HS, Ajina M, Lahouel MA, Khairi H, Saad AE. Etats épididymaire, prostatique et vésiculaire en relation avec les paramètres du spermogramme chez les hommes consultant pour infertilité *Andrologie* 1994; 4(4):451-458.
- [4] Kasperczyk A, Dobrakowski M, Horak S, Zalejska-Fiolka J, Birkner E. The influence of macro and trace elements on sperm quality *J Trace Elem Med Biol*, 2015; 30:153-159.
- [5] Wong W.Y, Flik G., Groenen P.M, Swinkels D.W, Thomas C.M, Copius-Peereboom J.H, Merkus H.M, Steegers-Theunissen R.P. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod Toxicol*. 2001; 15(2): 131-136.
- [6] Sakandé J., Kabré E., Ekue-Ligan A., Ouédraogo H. A et S. M. Relation entre les anomalies du spermogramme et les constituants biochimiques du liquide séminal de sujets consultant pour hypofertilité masculine à Ouagadougou *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 2012; 6(3):1167-1178.
- [7] Umeyama T, Ishikawa H, Takeshima H, Yoshii S, Koiso K. A comparative study of seminal trace elements in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1986; 46: 494-9.
- [8] Rosecrans R.R. , Jeyendran R.S. Perez-Pelaez M. and Kennedy W.P. Comparison of Biochemical Parameters of Human Blood Serum and Seminal Plasma *Andrologia* 1987;19(6):625-628.
- [9] Wong W.Y, Merkus H.M, Thomas C.M, Menkveld R, Zielhuis G.A, Steegers-Theunissen R.P. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril*. 2002; 77(3):491-8.
- [10] Skandhan K.P. and Mazumdar B.N. Correlation of Sodium and Potassium in Human Seminal Plasma with Fertilizing Capacity of Normal, and Infertile Subjects. *Andrologia* 1981; 13(2):147-154.



- [11] Adamopoulos D.A, Deliyannis V. Seminal plasma magnesium, calcium and inorganic phosphate concentration in normozoospermic and subfertile men. *Andrologia*. 1983; 15(6):648-54.
- [12] Xu B, Chia SE, Tsakok M, Ong CN. Trace elements in blood and seminal plasma and their relationship to sperm quality. *Reprod Toxicol*. 1993; 7(6): 613-8.
- [13] Banjoko S. O., Adeseolu F. O. Seminal Plasma pH, Inorganic Phosphate, Total and Ionized Calcium Concentrations in the Assessment of Human Spermatozoa Function. *J Clin Diagn Res* 2013 Nov, Vol-7(11): 2483-2486
- [14] Marín-Briggiler CI, Gonzalez-Echeverría F, Buffone M, Calamera JC, Tezón JG, Vazquez-Levin MH. Calcium requirements for human sperm function *in vitro*. *Fertility and Sterility*, 2003; 79(6): 1396-1403.
- [15] Kwon W.S, Park Y.J, Mohamed el-SA, Pang M.G. Voltage-dependent anion channels are a key factor of male fertility. *Fertility and Sterility*, 2013; 99(2): 354-361.
- [16] Akinloye O., Abbiyesuku F. M., Oguntibeju O. O., Arowojolu A. O., Truter E. J. The impact of blood and seminal plasma zinc and copper concentrations on spermogram and hormonal changes in infertile Nigerian men. *Reproductive Biology*, 2011; 11( 2 ): 83-97.
- [17] Organisation mondiale de la santé (OMS). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010; 5:249.
- [18] Martins AD, Bernardino RL, Neuhaus-Oliveira A, Sousa M, Sá R, Alves MG, Oliveira PF. Physiology of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers in the Male Reproductive Tract: Relevance for Male Fertility *Biol Reprod*. 2014; 91(1):11.
- [19] Torres-Flores V, García-Sánchez NL, González-Martínez MT. Intracellular sodium increase induced by external calcium removal in human sperm. *J Androl.* 2008; 29(1):63-9.
- [20] Ruskova S, Hlebarova M, Danev S, Karakasheva V. Biochemical and morphological studies of the semen from males with diseases of the reproductive system. *Andrologie*. 1972; 4(1):17-24.
- [21] Marzec-Wróblewska U., Kamiński P., Łakota P., Szymański M., Wasilow K., Ludwikowski G., Kuligowska-Prusińska M., Odrowąż-Sypniewska G., Stuczyński T., Woźniak A. The employment of IVF techniques for establishment of sodium, copper and selenium impact upon human sperm quality. *Reprod. Fertil. Dev.* 2015 DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/RD15041>
- [22] Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Ion Channels in Sperm Physiology and Male Fertility and Infertility *J Androl*. 2012; 33(5): 777-88.
- [23] Cejudo-Roman A, Pinto FM, Subirán N, Ravina CG, Fernández-Sánchez M, Pérez-Hernández N, Pérez R, Pacheco A, Irazusta J, Candenás L. The voltage-gated sodium channel nav1.8 is expressed in human sperm. *PLoS One*. 2013; 8(9):e76084.
- [24] Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sub>v</sub>2p channel. 2006; 439(7077):737-40.
- [25] Bertrand Dussol Équilibre potassique, hypokaliémie et hyperkaliémie *Néphrologie & Thérapeutique*, 2010; 6(3):180-199.
- [26] John M. Russell Sodium-Potassium-Chloride Cotransport *Physiol Rev*. 2000 Jan; 80(1):211-76.
- [27] Wertheimer EV, Salicioni AM, Liu W, Trevino CL, Chavez J, Hernández-González EO, Darszon A, Visconti PE. Chloride Is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 2008; 283(51):35539-50.
- [28] Sundaram V, Srinivas M, Gurunathan J, Rao K, Maniyan R P, Balasundaram S Influence of trace elements and their correlation with semen quality in fertile and infertile subjects *Turk. J Med Sci* 2013; 43:1000-1007.
- [29] Owen DH, Katz DF. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J Androl* 2005; 26: 459-469.
- [30] Zheng LP, Wang HF, Li BM, Zeng XH. Sperm-specific ion channel: targets holding the most potential for male contraceptives in development *Contraception*. 2013; 88(4):485-91.
- [31] Bretan P. N., Vigneron D. B., McClure R.D., Hricak H., Tom R.A., Moseley M., Tanagho E.A., James T.L. Assessment of male infertility: Correlation between results of semen analysis and phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *Urology*, 1989; 33( 2 ) : 116-119.
- [32] Sun W, Chen L, Zhang W, Wang R, Goltzman D, Miao D. Active vitamin D deficiency mediated by extracellular calcium and phosphorus results in male infertility in young mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015; 308(1):51-62.
- [33] Abou-Shakra FR, Ward NI, Everard DM. The role of trace elements in male infertility. *Fertil Steril* 1989; 52:307-10.
- [34] Ghoshal S, Sengupta T, Dundung SR, Majumder GC, Sen PC Characterization of a low-molecular-mass stimulator protein of Mg<sup>2+</sup>-independent Ca<sup>2+</sup> ATPase: effect on phosphorylation/dephosphorylation, calcium transport and sperm-cell motility. *Biosci Rep*. 2008; 28(2):61-71.
- [35] Marzec-Wróblewska U, Kamiński P, Łakota P, Szymański M, Wasilow K, Ludwikowski G, Kuligowska-Prusińska M, Odrowąż-Sypniewska G, Stuczyński T, Michałkiewicz J. Zinc and Iron Concentration and SOD Activity in Human Semen and Seminal Plasma *Biol Trace Elem Res* 2011;143:167-177.
- [36] Aydemir B, Kiziler AR, Onaran I, Alici B, Ozkara H, Akyolcu MC. Impact of Cu and Fe concentrations on oxidative damage in male infertility. *Biol Trace Elem Res* 2006; 112(3):193-203.
- [37] Kwenang A, Kroos MJ, Koster JF, van Eijk HG. Iron, ferritin and copper in seminal plasma. *Hum Reprod*. 1987; 2(5):387-8.

# **ANNEXE B DES GENERALITES**

**Tableau i :** Pathologies de la spermatogenèse

<b>Atteintes testiculaires par des agents exogènes</b>	Orchites et épididymorchites	Orchites virales Orchites et épididymorchites bactériennes
	Varicocèle	
	Torsion testiculaire	
<b>Atteinte testiculaire d'origine génétique</b>	Anomalies du nombre de chromosomes	Syndrome de Klinefelter (47XXY) Syndrome 47,XXY Syndrome de mâle XX (46XX) Dygénésie gonadique mixte (45XO/46XY)
	Anomalies de structure des chromosomes	Autosomes (1,3,5,6,9,10)
		Chromosomes sexuels
Atteintes chromosomiques non encore localisées	Syndrome de Kartagener Globozoospermies	
<b>Atteintes d'origine endocrinienne</b>	Atteintes du système endocrinien	Syndrome de Kallman Syndrome de Prader-Labardt-Willi Hypoplasie congénitale de la surrénale Syndrome de Laurence-Moon et syndrome de Bardet-Biedel Insuffisance hypophysaire congénitale Déficit isolé en LH et en FSH
	Atteinte dans la biosynthèse et l'action des androgènes	
<b>Molécules de signalisation</b>		

**Tableau ii : Normes de l’OMS 2010**

<b>Paramètres</b>	<b>Normes de l’OMS 2010</b>	<b>Anomalies</b>
<b>Couleur</b>	Gris opalescent	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Couleur jaune</li> <li>- Couleur brune</li> </ul>
<b>Viscosité</b>	Normal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyperviscosité</li> <li>- Hypoviscosité</li> </ul>
<b>pH</b>	$7,2 \leq \text{pH} \leq 8$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\text{pH} &lt; 7,2</math> acide</li> <li>- <math>\text{pH} &gt; 8</math> alcalin</li> </ul>
<b>Volume</b>	$1,5 \leq V \leq 6\text{ml}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- aspermie <math>V = 0</math></li> <li>- hypospermie <math>V &lt; 1,5\text{ml}</math></li> <li>- hyperspermie <math>V &gt; 6\text{ml}</math></li> </ul>
<b>Numération</b>	$15 \leq n \leq 200\text{millions/ml}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Azoospermie <math>n = 0</math></li> <li>- oligozoospermie <math>n &lt; 15\text{millions/ml}</math></li> <li>- polyspermie <math>n &gt; 200\text{millions/ml}</math></li> </ul>
<b>Mobilité à la première heure</b>	$a+b \geq 32\%$ $a+b+c \geq 40\%$	asthénozoospermie primaire $a+b+c < 40\%$ ou $a+b < 32\%$
<b>Mobilité à la quatrième heure</b>		Asthénozoospermie secondaire Baisse de la mobilité de 50% à la quatrième heure
<b>Numération des leucocytes</b>	$< 1,0 \text{ million/ml}$	Leucospermie $n > 1\text{million/ml}$
<b>Morphologie des spermatozoïdes</b>	$\geq 4 \%$ (selon Kruger)	Tératozoospermie $n < 4 \%$



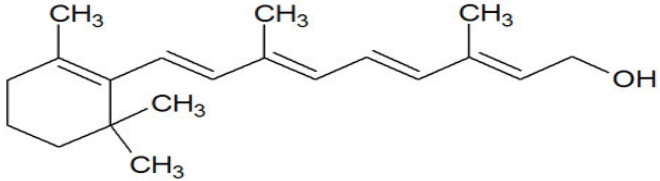
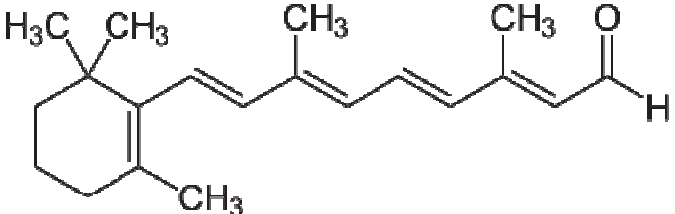
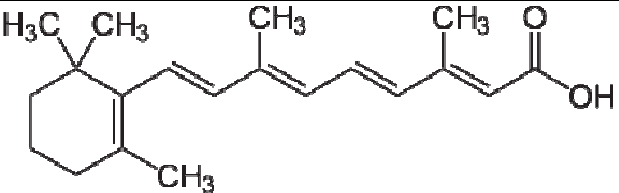
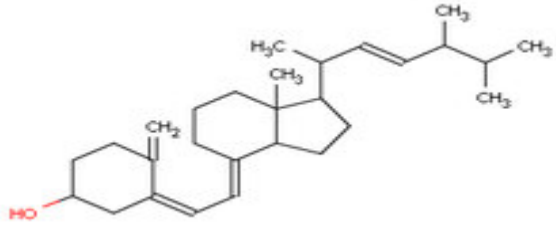
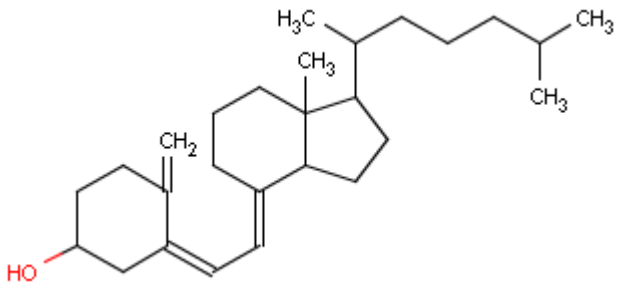
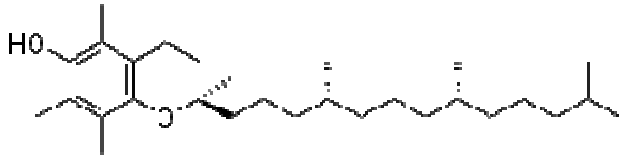
**Tableau iii** : Marqueurs du plasma séminal témoignant de l'activité des glandes annexes  
 (Source : **Lansac & Guérif 2005**)

<b>ORIGINE ANATOMIQUE</b>	<b>MARQUEURS</b>	<b>VALEUR DE REFERENCE (µM PAR EJACULAT)</b>
Epididyme	L-Carnitine	650
	alpha-glucosidase	60
Vésicules séminales	Fructose	13
Prostate	Zinc	2,5
	Acide citrique	52
	Phosphatases alcalines	1200

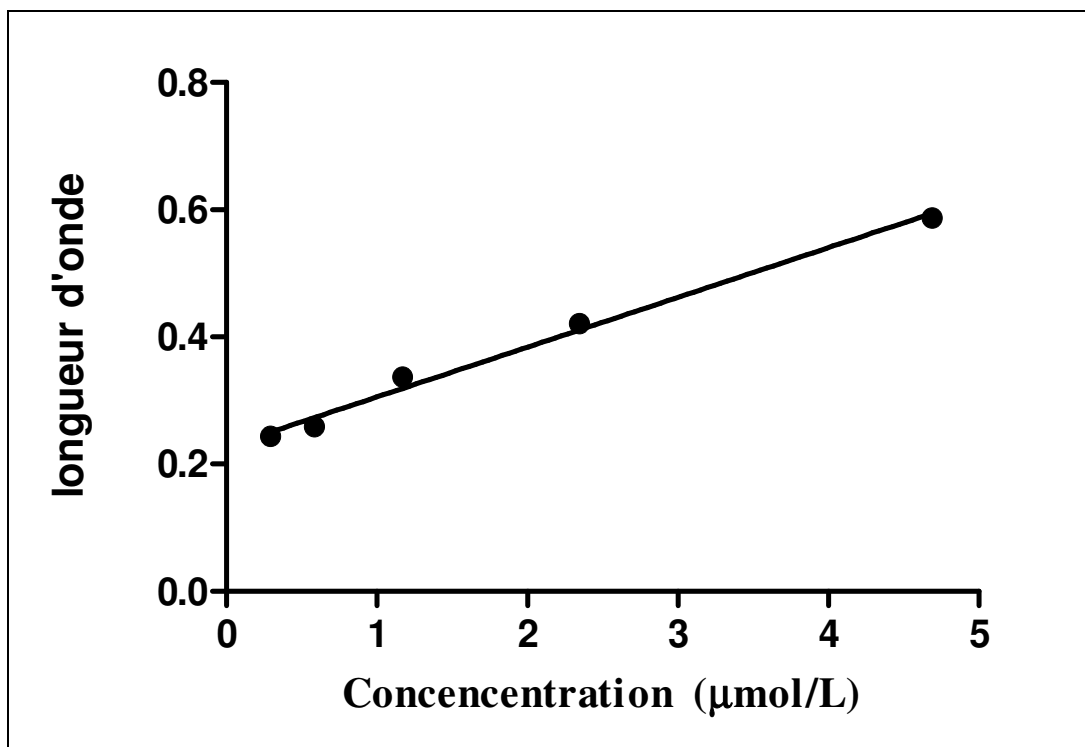
**Tableau iv** : Bilan d'une azoospermie obstructive (Source : **Schill et al, 2008**)

	<b>Obstruction proximale</b>	<b>Obstruction proximale au niveau de l'épididyme</b>	<b>Obstruction distale ABCD</b>	<b>Obstruction distale avec déférents palpables</b>
<b>Analyse de sperme</b>	<p>Azoospermie ou oligozoospermie sévère</p> <p>Ejaculat de volume normal</p> <p>Fructose normal</p> <p>pH alcalin &gt;7</p> <p>Marqueurs biochimiques épидидymaires normaux</p>	<p>Azoospermie ou oligozoospermie sévère</p> <p>Ejaculat de volume normal</p> <p>Fructose normal</p> <p>pH alcalin &gt;7</p> <p>Marqueurs biochimiques épидидymaires bas</p>	<p>Azoospermie ou oligozoospermie sévère</p> <p>Ejaculat de volume bas</p> <p>Fructose bas</p> <p>pH acide &lt;7</p>	<p>Azoospermie ou oligozoospermie sévère</p> <p>Ejaculat de volume bas</p> <p>Fructose bas</p> <p>pH acide &lt;7</p>
<b>Echographie scrotale</b>	<p>Dilatation isolée du rete testis</p>	<p>Augmentation du volume de l'épididyme</p> <p>Epididymene hy poéchogène</p> <p>Dilatation de l'épididyme</p>	<p>Dilatation des canaux efférents</p> <p>Arrêt brutal au niveau du corps de l'épididyme</p>	<p>Epididyme obstructif</p>
<b>Echographie endorectale</b>	<p>Normale ou signes de prostatite chronique</p>	<p>Normale ou signes de prostatite chronique</p>	<p>Absence d'ampoule du déférent, 90% d'anomalies des vésicules séminales (allant d'une absence uni ou bilatérale à une hypoplasie, kystes, calcifications, aspect hyperéchogène)</p>	<p>Kyste médian (mullérien/utriculaire ou woffien)</p> <p>Dilatation des vésicules séminales</p> <p>Kyste des vésicules séminales</p> <p>Lithiase des canaux éjaculateurs ou des ampoules des déférents</p> <p>Prostatite chronique (aspect inégal de la région périphérique)</p> <p>Cancer de la prostate</p>

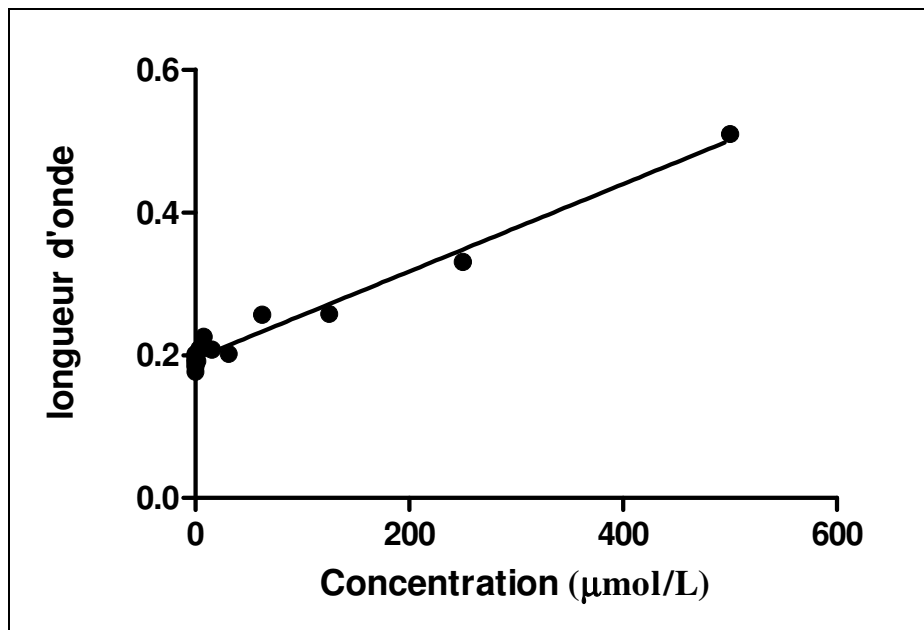
**Tableau v** : Formule chimique des vitamines A, D et E

Vitamine A	RETINOL	
	RETINAL	
	ACIDE RETINOÏQUE	
VITAMINE D	VITAMINE D2	
	VITAMINE D3	
VITAMINE E	$\alpha$ -TOCOPHEROL	

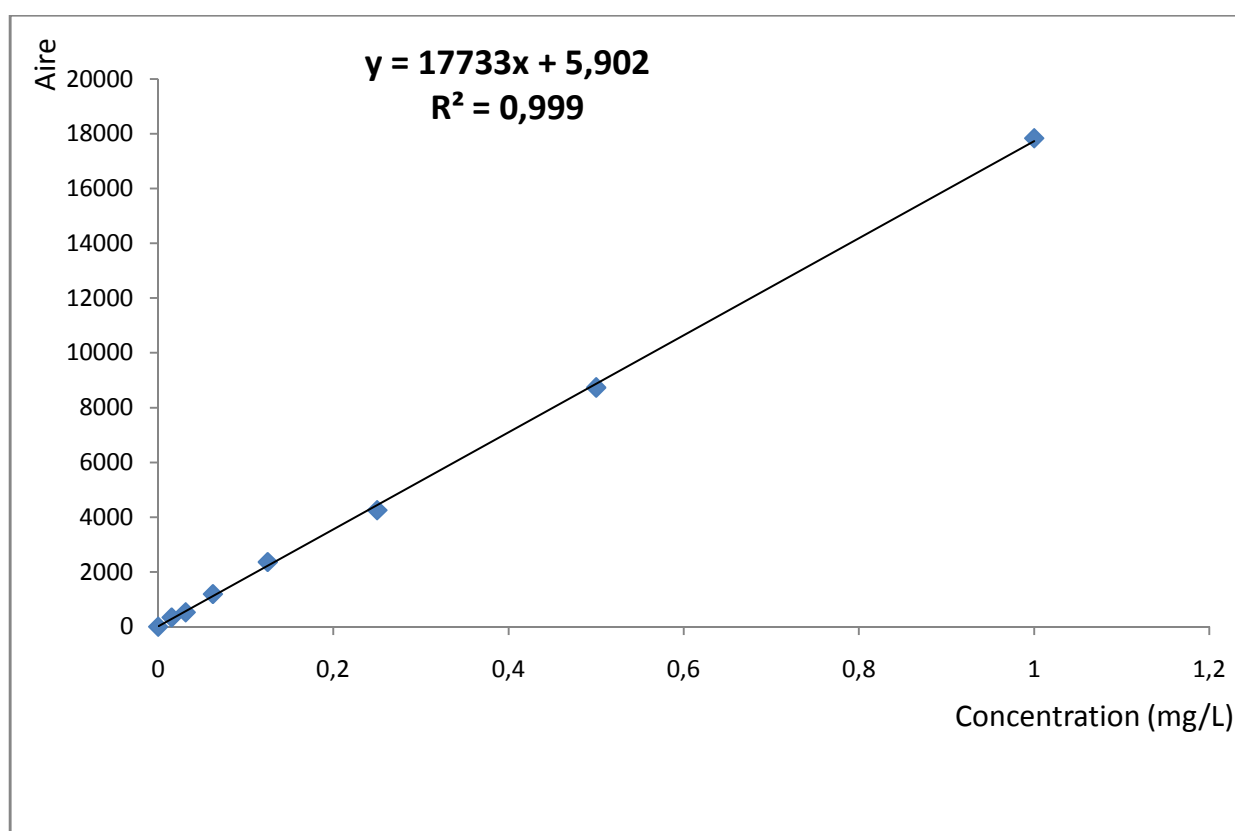
# **ANNEXE C DE LA METHODOLOGIE**



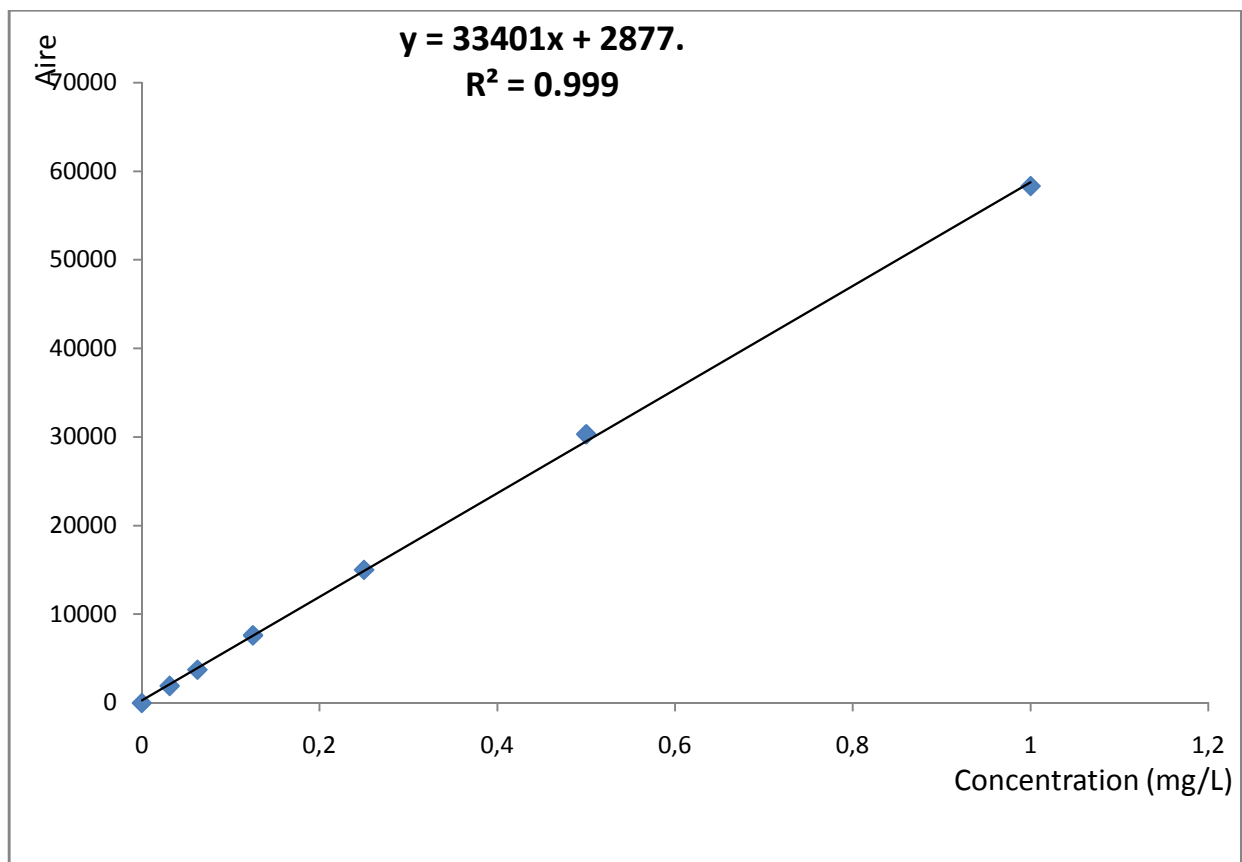
**Figure i :** Droite d'étalonnage du Malonyldialdéhyde



**Figure ii :** Droite d'étalonnage du sulfate de fer pour la mesure de l'activité antioxydante totale.

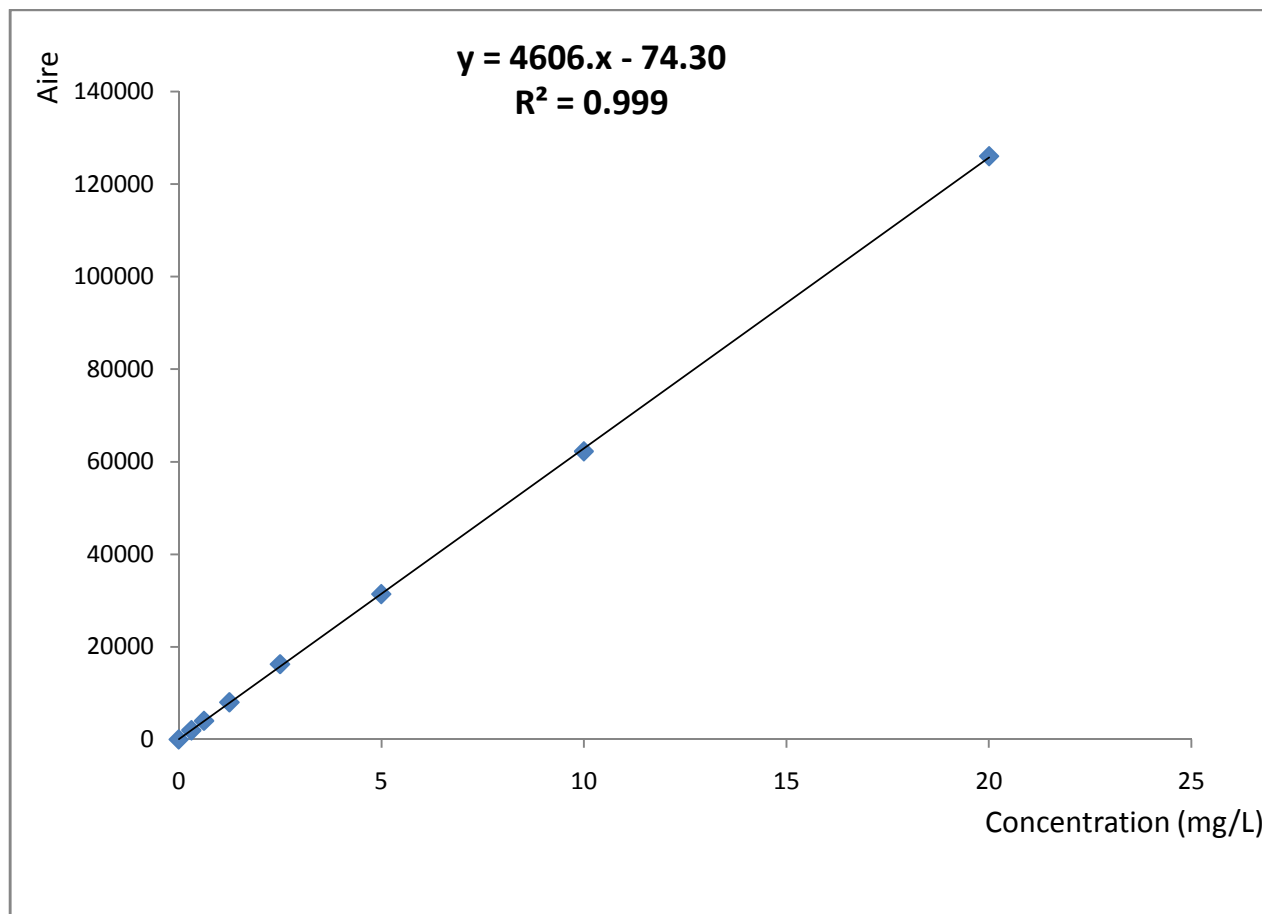


**Figure iii** : Droite d'étalonnage du rétinol.



**Figure iv** : Droite d'étalonnage du cholécalciférol.





**Figure v** : Droite d'étalonnage de l'alpha tocophérol.

## RESUME

L'évaluation de nouveaux biomarqueurs du plasma séminal des azoospermes a pour objectif d'identifier les éléments minéraux, les marqueurs du stress oxydatif, les vitamines A, D, E, pouvant servir de marqueurs biochimiques discriminants dans l'exploration de l'azoospermie. Cette étude a permis d'analyser 850 échantillons de spermes parmi lesquels ont été sélectionnés 30 échantillons normozoospermiques et 30 échantillons azoospermiques pour l'identification des biomarqueurs. Ainsi le dosage du fer, du magnésium et du phosphate inorganique a été fait à partir du Cobas® c311 de Roche/Hitachi. L'automate Roche® 9180 Electrolyte Analyser a été utilisé pour le dosage du sodium, du potassium, du chlore et du calcium. La détermination de la TAC et du MDA a été réalisée à partir d'un spectrophotomètre. La chaîne HPLC a permis de réaliser le dosage simultané des vitamines A D E dans le plasma séminal. Les résultats obtenus ont montré que seulement 2 % des spermes analysés présentaient une normozoospermie. La concentration du plasma séminal en éléments minéraux ne présentait pas de valeur diagnostique pour l'azoospermie. La différence de concentration en MDA du plasma séminal des azoospermes et des normozoospermes n'était pas significative. Tandis que celle de la TAC était significative et pourrait servir de biomarqueur de différenciation. Concernant les vitamines A, D, E, seul la vitamine D ne peut pas servir de biomarqueur de différenciation des spermes normozoospermiques et azoospermiques.

Mots clé : azoospermie, normozoospermie, plasma séminal, biomarqueur

## ABSTRACT

Evaluation of new biomarkers of the seminal plasma of azoosperms aims to identify mineral elements, markers of oxidative stress, vitamins A, D, E, which can serve as discriminating biochemical markers in the exploration of azoospermia. This study has allowed analyzing 850 samples of sperm whose 30 normozoospermic and 30 azoospermic samples were selected for the identification of biomarkers. So determination of iron, magnesium and inorganic phosphate was made from Roche / Hitachi Cobas® c311. The Roche® 9180 Electrolyte Analyzer was used for the determination of sodium, potassium, chlorine and calcium. Determination of TAC and MDA was performed from a spectrophotometer. The HPLC chain has allowed carrying out simultaneous dosing of the vitamins A D E in the seminal plasma. The results obtained, showed that only 2 % of the sperm analyzed showed normozoospermia. The concentration of seminal plasma in mineral elements did not have any diagnostic value for azoospermia. The difference in MDA concentration of the seminal plasma of azoosperm and normozoosperm was not significant. While that of TAC was significant and could serve as a biomarker of differentiation. Concerning vitamins A, D, E, only vitamin D cannot be used as biomarker for differentiation of normozoospermic and azoospermic sperm.

Keywords: azoospermia, normozoospermia, seminal plasma, biomarker