

UNIVERSITE DE YAOUNDE 1

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE 1

CENTER FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES
IN LIFE, HEALTH AND
ENVIRONMENTAL SCIENCES

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE DE LA FACULTE DE MEDECINE ET DES SCIENCES
BIOMEDICALES
*LABORATORY OF BIOCHEMISTRY OF THE FACULTY OF MEDECINE AND BIOMEDICAL
SCIENCES*

**Les anomalies spermatiques responsables des
infertilités masculines à Yaoundé : aspects
épidémiologiques et biochimiques.**

THESE

Présentée en vue de l'obtention du Doctorat/PhD en Biochimie

Option: Biotechnologie et Développement

Par :

TCHOULA MAMIAFO Corinne

Matricule : 05T264

Master en Biochimie



Devant le jury composé de :

Président Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul, Professeur, Université de Yaoundé I
Rapporteurs Pr. NGOGANG Jeanne, Professeur Emérite, Université de Yaoundé I
Pr. PIEME Constant Anatole, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I
Membres Pr. WATCHO Pierre, Professeur, Université de Dschang
Pr. DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré, Professeur, Université de Yaoundé I
Pr. PENLAP NINTCHOM Véronique Epse BENG, Professeur, Université de Yaoundé I

Année académique 2021-2022

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCE DE
LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING
IN GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH
AND ENVIRONMENTAL SCIENCES



UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE EN SCIENCE DE LA VIE

RESEARCH DOCTORATE TRAINING UNIT
IN LIFE SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, Pr. DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré et Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul respectivement Examineur et Président du jury de Thèse de Doctorat/PhD en Biochimie, spécialité Biotechnologie et développement, soutenue par Mme TCHOULA MAMIAFO Corinne (matricule: 05T264) le 07 Février 2022 à 10h dans la salle S01/02 Extension de la Faculté de Sciences de l'Université de Yaoundé I sur le thème intitulée «**Les infertilités masculines dues aux anomalies spermatiques à Yaoundé : aspects épidémiologiques et biochimiques.**» attestons que la candidate a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le 23 MARS 2022

Examineur

Président du Jury

Le Chef de Département



**UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES**

**DEPARTEMENT DE
BIOCHIMIE**

**CENTRE DE RECHERCHE ET
FORMATION DOCTORAL, SCIENCE
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT
(CRFD-SVSE)**



**THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCES**

**DEPARTMENT OF
BIOCHEMISTRY**

**CENTRE FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES
IN LIFE HEALTH & ENVIRONMENTAL
SCIENCES (CRFD-SVSE)**

**LABORATOIRE DE BIOCHIMIE DE LA FACULTE DE MEDECINE ET DES SCIENCES
BIOMEDICALES**
LABORATORY OF BIOCHEMISTRY OF THE FACULTY OF MEDICINE AND BIOMEDICAL SCIENCES

**Les infertilités masculines dues aux anomalies
spermatiques à Yaoundé : aspects épidémiologiques
et biochimiques.**

THÈSE

**Présentée et soutenue comme requis partiel en vue de l'obtention du Doctorat/ Ph.D. en
Biochimie**

Spécialité : Biotechnologies et Développement

Par :

TCHOULA MAMIAFO Corinne

Matricule : 05T264

Master en Biochimie

Devant le Jury composé de :

Président Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul, Professeur, Université de Yaoundé I
Rapporteurs Pr. NGOGANG Jeanne, Professeur Emérite, Université de Yaoundé I
Pr. PIEME Constant Anatole, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I
Membres Pr. WATCHO Pierre, Professeur, Université de Dschang
Pr. DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré, Professeur, Université de Yaoundé I
Pr PENLAP NINTCHOM Véronique Epse BENG, Professeur, Université de
Yaoundé I

Année académique 2021 - 2022

LISTE PROTOCOLAIRE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 22 septembre 2021

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA : ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*

Chef Division des Affaires Académiques, de la Sclolarité et de la Recherche DAASR : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOUGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	EWANE Cécile Anne	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste

20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
25	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
26	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
27	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste

35	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
36	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
37	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (46)
--

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	DAARS/FS
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	Vice Doyen/FMSB/UYI
7	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8	KAMTCHOING Pierre	Professeur	En poste
9	KEKEUNOU Sévior	Professeur	En poste
10	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
11	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
12	NOLA Moïse	Professeur	En poste
13	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
14	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE
15	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste

19	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
21	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
22	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
23	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

24	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
25	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
26	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
27	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
28	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
32	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
33	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
34	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
35	NGOULATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
36	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
37	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
38	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
39	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
40	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste

42	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
43	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
45	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
46	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MBOLO Marie	Professeur	En poste
5	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
6	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
7	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

8	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
9	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
10	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
11	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
12	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI

14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste

18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste

27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (33)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé deMiss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
10	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>

11	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
12	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste

19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
20	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste

21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste

31	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
32	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
33	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (34)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/FSE/UYI
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
5	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	Directeur/ MINESUP/ Chef de Département
6	WANDJI Jean	Professeur	En poste

7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	C.E/ MINESUP
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	C.S/ MINESUP
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	Doyen /FS/ UYI

25	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
26	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
27	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

28	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
29	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
30	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
31	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
32	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste

33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
5	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
6	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
7	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
8	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
10	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
11	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
12	MOTO MPOUE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	Directeur adjoint Enset. Ebolowa
14	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOUE Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
2	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>

3	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
4	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
7	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
8	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes & Diplômes/FS/UYI</i>
9	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
10	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
16	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
19	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
20	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
22	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
23	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste

26	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
27	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thierry	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste

4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste

6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste

13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. UN</i>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
6	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
9	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen FS Univ/Bda
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
22	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
23	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
25	SAIDOU	Maître de Conférences	MINRESI

26	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UIYI</i>

30	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
34	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
35	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
36	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
37	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
38	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

39	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
12	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
13	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
14	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
15	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
16	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
17	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance & du Matériel/UYII</i>
18	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
----	----------------------------	-----------------	----------

24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

41	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
42	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	14 (10)	13 (05)	3 (02)	38 (18)
BPA	15 (01)	8 (06)	18 (05)	05 (02)	46 (14)
BPV	07 (01)	10 (01)	9 (06)	07 (01)	33 (9)
CI	10 (01)	10 (02)	10 (02)	03 (0)	33 (5)
CO	6 (0)	21 (05)	05 (02)	02 (0)	34(7)
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	08 (01)	25 (2)
MAT	2 (0)	8 (0)	15 (01)	05 (02)	30 (3)
MIB	3 (0)	4 (02)	05 (01)	06 (02)	18 (5)
PHY	15 (0)	14 (02)	09 (03)	02 (0)	40 (5)
ST	7 (1)	15 (01)	18 (05)	02 (0)	42(7)
Total	75 (5)	105 (29)	116 (31)	43 (10)	339 (75)

Soit un total de **339 (75)** dont :

- Professeurs **75 (5)**
- Maîtres de Conférences **105 (29)**
- Chargés de Cours **116 (31)**
- Assistants **43 (10)**

() = Nombre de Femmes

75

A purple rectangular box with rounded corners and a slight 3D effect, containing the word "DEDICACE" in bold, black, uppercase letters.

DEDICACE

A mes parents,

Mr TCHOULA Martin et Mme TCHOULA Martine.

REMERCIEMENTS

Je remercie de tout mon cœur tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, notamment :

Mon superviseur, Pr **NGOGANG YONKEU Jeanne**, pour l'orientation que vous avez donnée à ce travail, les conseils et les encouragements.

Pr **PIEME Constant Anatole**, pour votre disponibilité, pour l'attention, la patience et l'encadrement.

Pr **MOUNDIPA FEWOU Paul**, chef du Département de Biochimie, pour le confort académique assuré lors de nos enseignements.

Tous les enseignants du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I, pour tout ce que vous m'avez appris.

Pr **GONSU KAMGA Hortense**, pour votre aide, votre soutien et vos encouragements.

Pr **AMA MOOR Vicky Jocelyne**, pour votre disponibilité et vos conseils.

Pr **BOUM II Yap**, pour le mentorat, votre disponibilité et vos conseils.

Les patients ayant accepté de participer à cette étude, merci pour votre coopération, et votre patience.

Le personnel du laboratoire d'analyses médicales du Centre (LAMC), merci pour votre soutien lors de la collecte des données et votre aide lors des analyses biologiques.

Le personnel du service de gynécologie et du laboratoire de Biochimie du Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé, merci pour l'aide apportée lors de la collecte des données et lors des analyses biologiques.

Le personnel du laboratoire Béthanie de Melen-Yaoundé pour votre aide lors de la collecte des données.

Le personnel de laboratoire GTAB de Yaoundé pour votre aide lors de la collecte des données.

Le personnel du service de maternité de l'Hôpital Central de Yaoundé pour votre aide lors de la collecte des données.

Le personnel du service de gynécologie de l'Hôpital Général de Yaoundé pour votre aide lors de la collecte des données.

Mes frères et sœurs, **Théophile, Ghislain, Armand, Adrienne, Kéline, Ronald, Daryl, Dimitri**, pour vos encouragements.

Mon fils, **Nolan Martin**, pour la force et le courage que tu me donnes d'aller plus loin encore.

Sébastien H. AUBRESPY pour toute l'aide et le soutien.

Mes compagnons de laboratoire **Dr MOUKETTE Bruno, Dr TANKEU Francine, Mme BONGOE Pauline**, pour toute l'aide et le soutien.

Dr TEBOU MAMBOU Gaël Christian, pour tes encouragements et ton soutien.

Mes **camarades de promotion**, pour les moments partagés avec vous.

A toute ma famille, tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'édification de cette œuvre, merci encore.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	i
LISTE DES ABREVIATIONS	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
RESUME	xiii
SUMMARY	xvi
INTRODUCTION ET PROBLEMATIQUE	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	7
I. Revue de la littérature	8
I.1 Quelques définitions	8
I.2 Spermatozoïde, Spermatogenèse, Sperme	9
I.2.1 Origine du spermatozoïde	9
I.2.2 Ultrastructure du spermatozoïde	9
I.2.3 La spermatogenèse.....	10
I.2.4 Etapes de la spermiogénèse	11
I.2.5 Contrôle endocrinien de la spermatogenèse.	11
I.2.6 Contrôle génétique de la spermatogenèse.....	12
I.2.7 Caractéristiques du sperme éjaculé.....	13
I.3 Les Mécanismes de l'infertilité masculine	14
I.3.1 Causes « pré-testiculaires ».....	14
I.3.2 Causes testiculaires	16
I.3.3 Causes « post-testiculaires » par obstacle des voies excrétrices.....	20
I.3.4 Infertilités masculines idiopathiques.....	22
I.4 Déterminants de l'infertilité masculine	22
I.4.1 Déterminants du style de vie.....	22
I.4.2 Effets environnementaux	30
I.5 Infertilité masculine et les infections	33
I.5.1 Les infections des glandes accessoires mâles	33
I.5.2 IST Virale.....	36

I.5.3 <i>Trichomonas vaginalis</i>	37
I.5.4 Syphilis	38
I.6 Diagnostic de l'infertilité masculine : exploration initiale	38
I.6.1 Interrogatoire.....	38
I.6.2 Examen clinique.....	38
I.6.3 Le spermogramme	39
I.6.4 Exploration hormonale.....	41
I.7 Infertilité masculine et stress oxydatif	42
I.7.1 Production intrinsèque d'ERO	42
I.7.2 Facteurs extrinsèques d'ERO.....	43
I.7.3 Rôle physiologique des ERO sur le sperme.....	45
I.7.4 Effets pathologiques des ERO sur la spermatogenèse et la fonction des spermatozoides.	46
I.7.5 Rôle physiologique des antioxydants.....	47
I.7.6 Effets pathologiques des antioxydants.....	49
Chapitre II : Matériel et Méthodes.....	50
II. Matériel et Méthodes	50
II.1 Matériel	51
II.2 Méthodes	51
II.2.1 Type d'étude	51
II.2.2 Durée de l'étude.....	51
II.2.3 Lieux de l'étude	52
II.2.4 Recrutement des participants	52
II.2.5 Processus de collecte de données	52
II.2.6 Les prélèvements	53
II.2.7 Recherche de microorganismes impliqués dans l'infertilité.....	54
II.2.7.1 Dépistage de la Syphilis, du SIDA, de l'hépatite B et de l'hépatite C.	54
II.2.7.1.1 Test de diagnostic rapide (TDR).....	54
II.2.7.1.2 Méthode d'ELISA	56
II.2.7.2 Diagnostic indirect du Chlamydia : Technique Immunocomb.....	57
II.2.7.3 Recherche des mycoplasmes uro-génitaux	58
II.2.7.4 Réalisation de l'antibiogramme	59

II.2.8 Analyse du sperme.....	62
II.2.8.1 Analyse Cytobactériologique du sperme.....	62
II.2.8.2 Spermogramme.....	64
II.2.9 Dosage du fructose dans le plasma séminal	69
II.2.10 Dosage des hormones	71
II.2.10.1 Dosage sérique de l’Inhibine B.....	71
II.2.10.2 Dosage sérique de la <i>Folliculine Stimulating Hormone</i> (FSH).....	72
II.2.11 Dosage des marqueurs du statut oxydatif dans le plasma séminal	73
II.2.11.1 Dosage des marqueurs antioxydants.....	73
II.2.11.1.1 La catalase	73
II.2.11.1.2 Glutathion Péroxydase (EC 1.11.1.9).....	74
II.2.11.1.3 Superoxyde dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1).....	75
II.2.11.1.4 Détermination de la capacité antioxydante totale par la <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (FRAP)	76
II.2.11.1.5 Dosage du glutathion réduit.....	77
II.2.11.1.6 Dosage des protéines totales.....	78
II.2.11.1.7 Dosage de la vitamine E	79
II.2.11.2 Les marqueurs pro-oxydants	80
II.2.11.2.1 Dosage du Malondialdéhyde (MDA)	80
II.2.11.2.2 Dosage du nitrite (NO ₂).....	81
II.2.11.2.3 Détermination du peroxy-nitrite	82
II.2.11.2.4 Peroxydes plasmatiques totaux (PPT)	82
II.2.12 Analyses statistique	83
II.2.13 Considérations Ethiques	83
Chapitre III : Résultats et Discussion.....	84
III. Résultats	85
III.1 Les déterminants de l’infertilité masculine	85
III.1.1 Caractéristiques générales de l’échantillon d’enquête	85
III.1.2 Répartition des patients selon l’âge.....	87
III.1.3 Répartition des patients selon l’indice de masse corporelle (IMC)	88
III.1.4 Répartition des patients selon le statut marital.....	90
III.1.5 Répartition de la population selon les régions d’origine et de résidence	92

III.1.6 Répartition des patients selon la situation professionnelle.....	92
III.1.7 Fertilité personnelle des CAS.....	95
III.1.8 Tableau clinique des Patients	96
III.1.9 Antécédents chirurgicaux	97
III.1.10 Sexualité des patients	97
III.1.11 Alimentation et comportements à risque.....	98
III.1.11.1 Habitudes alimentaires	98
III.1.11.2 Comportements à risque.....	99
III.1.12 Fréquence des infections à HIV, Chlamydiae, Syphilis, Mycoplasme, et des hépatites B et C.	100
III.2 Analyse qualitative et quantitative du sperme.....	102
III.2.1 Evaluation qualitative.....	102
III.2.2 Evaluation quantitative.....	104
III.2.2.1 Comparaison des moyennes des paramètres du sperme au sein de la population d'étude.....	104
III.2.2.2 Répartition des patients selon le nombre de leucocytes	106
III.2.3 Etude des anomalies	106
III.2.4 Tests d'association des paramètres du sperme des Cas aux les autres variables ..	109
III.3.1 Dosage du Fructose séminal.....	111
III.3.1.1 Distribution de la population d'étude en fonction de la concentration en fructose	111
III.3.1.2 Tests d'association entre le fructose et d'autres variables dans le groupe de Cas	111
III.3.2 Dosage de la FSH et de l'Inhibine B	113
III.3.2.1 Distribution de la population en fonction des concentrations en Inhibine B et FSH.....	113
III.3.2.2 Corrélation entre les hormones et les autres variables dans le groupe de Cas ...	113
III.3.3 Etude du statut antioxydant et oxydant	115
III.3.3.1 Les marqueurs du statut antioxydant.....	115
III.3.3.1.1 Distribution de la population en fonction de la teneur séminale en marqueurs antioxydants	115

III.3.3.1.2	Corrélation entre les marqueurs antioxydants et les autres variables dans le groupe de Cas.	116
III.3.3.2	Les marqueurs du statut oxydant.....	119
III.3.3.2.1	Distribution de la population en fonction de la teneur séminale en marqueurs oxydants	119
III.3.3.2.2	Corrélation entre les marqueurs oxydants et les autres variables dans le groupe de Cas.	120
III.4	Discussion	123
	Conclusion	131
	Perspectives.....	131
	RÉFÉRENCES	134
	ANNEXES.....	a

LISTE DES ABREVIATIONS

ABCD:	Agénésies Bilatérale des Canaux Déférents
ABP:	<i>Androgen Binding Protein</i>
ADN:	Acide Désoxyribonucléique.
AFU:	Association française d'urologie.
AMH:	Hormone Anti-Müllérienne.
APA:	Age Paternel Avancé
ATP:	Adénosine TriPhosphate
AZF:	<i>Azoospermy factor</i>
BPA:	BisPhenol A
cAMP:	Adénosine MonoPhosphate cyclique
CAMs:	<i>Cell Adhesion Molecules</i>
CAT:	Catalase
CFTR:	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.</i>
CGP:	Cellules Germinales Primordiales.
CS:	Cellules de Sertoli
DAZ	<i>Deleted in Azoospermia</i>
DDT:	DicloroDiphénylTrichloroéthane
DHT:	Dihydrotestotérotone.
ECBU:	Examen CytoBactériologique des Urines.
EGF:	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ENP:	Enquête Nationale Périnatale
ERO:	Espèces Réactives de l'Oxygène
EUCAST:	<i>European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FGF:	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FIV:	Fécondation In Vitro
FSH:	<i>Follicle Stimulating Hormone.</i>
Gn-RH:	<i>Gonadotropin Releasing Hormon</i>
GPx:	Gluthation Peroxydase
HCG:	Hormone Chorionique Gonadotrope humaine
HHA:	Hypogonadismes Hypogonadotrophiques Acquis
HHC:	Hypogonadismes Hypogonadotrophiques Congénitaux
HSV:	Virus Herpès Simplex
IAC:	Insémination Artificielle avec sperme du Conjoint.
IAD:	Insémination Artificielle avec sperme du Donneur.
ICSI:	L'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes
IGAM:	Infection des Glandes Accessoires Mâles
IGF:	Insulinlike Growth Factor.
IIU:	Insemination Intra-Utérine

IL:	Interleukine
IMC:	Indice de Masse Corporelle
INSL3:	Insulinelike proteine 3.
IRM:	Imagerie à Résonance Magnétique
IST:	Infections sexuellement transmissibles
LH:	<i>Luteinizing Hormone.</i>
LRP:	<i>Liver Regulating Protein</i>
MDA:	MaloneDialdéhyde
MIS:	<i>Müllerian Inhibiting Substance.</i>
MMP:	Potentiel Membranaire Mitochondrial
NIDDK:	<i>National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney diseases</i>
NGF:	<i>Nerve Growth Factor</i>
OA:	Oligo-asthénospermie
OAT:	Oligo-Asthéno-Tératospermie
OATS:	Oligo-asthéo-tératospermie.
OMS:	Organisation mondial de la santé.
PCR:	Polymerase Chain Reaction
pH	Potential Hydrogène
PMA:	Procréaton Médicalement Assisté
RIA:	<i>Radio Immuno Assay</i>
SAMs:	<i>Substrate Adhesion Molecules</i>
SHBG:	<i>Sex Hormone Binding Globulin.</i>
SK:	Syndrome de Klinefelter
SOD:	SuperOxide Dismutase
SPZ:	Spermatozoïde
TDF:	<i>Testis Determing Factor.</i>
TGF:	<i>Transforming Growth Factor</i>
TMS:	Test de Migration Survie
TV:	<i>Trichomonas vaginalis</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Etiologie des hypogonadismes hypogonadotrophiques congénitaux (HHC) et acquis (HHA) responsables d'infertilité par atteinte pré-testiculaire.	16
Tableau II: Infertilités masculine par anomalies testiculaire d'origine chromosomique, génétique ou lésionnelle.	19
Tableau III: Infertilités masculines par anomalies « post-testiculaire ».....	21
Tableau IV: Valeurs normales du spermogramme.....	41
Tableau V: Interprétation des résultats de l'antibiogramme SIR MYCOPLASMA.....	61
Tableau VI: Profil de sensibilité naturelle attendue.....	61
Tableau XVIII: Dilution pour la numération des spermatozoides.	66
Tableau XIX: Seuil de normalité des différents paramètres spermatiques.	69
Tableau XXVI: Témoins de fructose.....	70
Tableau XXVII: Mode opératoire pour le dosage du fructose.....	70
Tableau XXVIII: Protocole de dosage de l'inhibine B.....	71
Tableau XXIX: Protocole de dosage de la FSH.....	73
Tableau XXX: Mode opératoire pour la détermination de l'activité de la catalase.....	74
Tableau XXXI: Protocole de dosage du glutathion peroxydase.....	75
Tableau XXXII: Protocole de dosage de la SOD.....	76
Tableau XXXIII: Mode opératoire pour la détermination de la capacité anti-oxydante totale	77
Tableau XXXIV: Mode opératoire pour la détermination du glutathion réduit.....	78
Tableau XXXV: Mode opératoire.....	79
Tableau XXXVI: Mode opératoire pour le dosage de la vitamine E.....	79
Tableau XXXVII: Etalonnage Vitamine E.....	80
Tableau XXXVIII: Mode opératoire pour la détermination du MDA.....	81
Tableau XXXIX: Protocole de dosage du Nitrite.	81
Tableau XL: Etalonnage Nitrite.....	81
Tableau XLI : Protocole de dosage du peroxydite.....	82
Tableau XLII: Protocole de dosage des peroxydes totaux.....	83
Tableau VII: Distribution de la population d'étude selon les antécédents médicaux.....	96
Tableau VIII: Régression logistique des antécédents médicaux les plus déterminants.	96
Tableau IX: Distribution de la population d'étude selon les antécédents chirurgicaux.....	97
Tableau X: Régression logistique des antécédents chirurgicaux les plus déterminants.....	97
Tableau XI: Distribution de la population d'étude en fonction de leur sexualité.....	98
Tableau XII: Distribution de la population d'étude selon leurs habitudes alimentaires.	99
Tableau XIII: Régression logistique des habitudes alimentaires liés à l'infertilité.....	99
Tableau XIV: Distribution de la population d'étude selon les comportements à risque.....	100

Tableau XV: Régression logistique des comportements à risque liés à l'infertilité	100
Tableau XVI: Distribution de la population d'étude en fonction de l'existence d'une infection.	101
Tableau XVII: Régression logistique des infections liées à l'infertilité	101
Tableau XX: Caractéristiques générales du sperme de la population générale.	104
Tableau XXI: Caractéristiques générales du sperme dans le groupe de Cas.	105
Tableau XXII: Distribution des Cas selon le type d'anomalies de la morphologie retrouvées.....	108
Tableau XXIII: Corrélation des paramètres du sperme par l'âge et l'IMC.....	109
Tableau XXIV: Corrélation des paramètres du sperme par la durée d'abstinence.	110
Tableau XXV: Régression logistique des facteurs déterminants significativement liés à une baisse de la numération des spermatozoïdes	110
Tableau XLIII: Distribution de la population en fonction de la concentration en fructose séminal.....	111
Tableau XLIV: Corrélation du fructose par l'âge et l'IMC	112
Tableau XLV: Corrélation des paramètres du sperme par le Fructose	112
Tableau XLVI: Distribution de la population en fonction des concentrations en Inhibine B et FSH.	113
Tableau XLVII: Corrélation des hormones FSH et Inhibine B par l'âge et l'IMC	114
Tableau XLVIII: Corrélation entre l'Inhibine B, la FSH et les paramètres du sperme	114
Tableau XLIX: Distribution de la population en fonction de la teneur séminale en marqueurs antioxydants	116
Tableau L: Corrélation des marqueurs antioxydants par l'âge et l'IMC.....	117
Tableau LI: Corrélation entre les marqueurs antioxydants et les paramètres du sperme.....	117
Tableau LII: Corrélation entre les marqueurs antioxydants par le fructose et les hormones.	118
Tableau LIII: Distribution de la population en fonction de la teneur séminale en marqueurs oxydants	119
Tableau LIV: Corrélations des marqueurs oxydants par l'âge et l'IMC.....	120
Tableau LV: Corrélation entre les marqueurs oxydants et les paramètres du sperme	120
Tableau LVI: Corrélation des marqueurs oxydants par le fructose, la FSH et l'Inhibine B. .	122

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Origine du spermatozoïde.....	9
Figure 2: Ultrastructure du spermatozoïde.....	10
Figure 3: la spermatogenèse.....	10
Figure 4: Les étapes de la spermiogenèse.....	11
Figure 5: Contrôle endocrinien de la spermatogenèse.....	12
Figure 6: Contrôle génétique de la spermatogenèse.....	13
Figure 7: Vision du chromosome Y avec les régions AZF.....	18
Figure 8: Vue anatomique schématique du trajet suivi par les spermatozoïdes depuis la libération dans la lumière des tubes séminifères jusqu'à l'expulsion lors de l'éjaculation.....	21
Figure 9: Orchidectomètre de Prader (permet d'évaluer le volume testiculaire).	39
Figure 10: Cause physiologiques et pathologiques de la production d'ERO.....	45
Figure 11: Role Physiologique (+) et pathologique (-) de l'oxydation sur les spermatozoïdes.....	45
Figure 12: Stress oxydatif et les dommages causés à l'ADN, à la mitochondrie et la membrane plasmique des spermatozoïdes.....	46
Figure 13: Catégorisation des anti-oxydants.....	48
Figure 14 : Principe du test de diagnostic rapide.....	54
Figure 15: Procédure de dépistage de la sérologie HIV. (WHO, 2005).....	55
Figure 16: Interprétation des résultats du TDR sur bandelette ou cassette.....	56
Figure 17: Schéma résumant la technique ELISA.....	56
Figure 18 :Procédure de dépistage du Chlamydia par la technique immunocomb.....	57
Figure 19: Lecture interprétative des résultats d'immunocomb.....	58
Figure 20: Microplaque SIR.....	59
Figure 21: Mode opératoire SIR MYCOPLASMA.....	61
Figure 22: L'hématimètre.....	66
Figure 23: Evaluation de la morphologie des spermatozoïdes.....	68
Figure 24 : Répartition de l'échantillon d'enquête.....	85
Figure 25: Distribution des patients selon le motif de la consultation.....	86

Figure 26: Répartition des patients selon la durée de l'infertilité	86
Figure 27: Répartition des patients selon la durée de l'infertilité	87
Figure 28: Distribution de la population d'étude en fonction de leur âge.....	87
Figure 29: Distribution de la population d'étude en fonction des classes d'âge.....	88
Figure 30: Fréquence du surpoids dans la population générale	89
Figure 31: Distribution de la population en fonction de l'IMC	89
Figure 32: Distribution des patients selon les différentes classes d'IMC	90
Figure 33: Régression linéaire de l'IMC en fonction de l'âge	90
Figure 34: Distribution de la population en fonction du statut marital	91
Figure 35: Distribution du statut Marital selon l'âge.	91
Figure 36: Distribution du statut marital selon l'IMC.....	92
Figure 37: Distribution des patients selon la région d'origine	92
Figure 38: Distribution des patients selon la région de résidence.....	93
Figure 39: Distribution de la population globale en fonction de la profession	93
Figure 40: Distribution des Cas selon l'activité professionnelle.....	94
Figure 41: Fréquence du surpoids selon l'activité professionnelle	94
Figure 42: Répartition des Cas selon le nombre d'enfants.....	95
Figure 43: Répartition des Cas selon des antécédents de PMA	95
Figure 44: Répartition de la population selon le nombre de relations antérieures.	95
Figure 45: Distribution de la population d'étude selon leur libido.	98
Figure 46: Distribution de la population d'étude selon la durée d'abstinence avant le prélèvement de sperme.....	102
Figure 47: Distribution de la population d'étude selon la couleur du sperme	103
Figure 48: Distribution de la population d'étude selon le temps de liquéfaction du sperme.	103
Figure 49: Répartition de la population en fonction des résultats de spermoculture.	103
Figure 50: Comparaison des moyennes des paramètres du sperme au sein de la population totale.....	105
Figure 51: Comparaison des moyennes des paramètres du sperme au sein du groupe de Cas.....	105
Figure 52: Distribution de la population d'étude en fonction de la présence de leucocytes..	106
Figure 53: Distribution des Cas selon les types d'anomalies.....	107
Figure 54: Distribution des Cas selon les anomalies du volume.....	107
Figure 55: Distribution des Cas selon les anomalies du nombre.	108

Figure 56: Distribution des Cas en fonction des types d'association d'anomalies retrouvées.	108
Figure 57: Régression linéaire du fructose par l'âge et l'IMC.....	112
Figure 58: Régression linéaire entre le fructose et les paramètres du sperme	112
Figure 59: Régression linéaire entre FSH, Inhibine B et les paramètres du sperme.....	114
Figure 60: Régression linéaire entre FSH et Inhibine B	115
Figure 61: Régression logistique entre FSH, Inhibine B et le Fructose	115
Figure 62: Régression linéaire entre les marqueurs antioxydant et les paramètres du sperme.	118
Figure 63: Régression linéaire des marqueurs antioxydants par le fructose et les hormones.	119
Figure 64: Régression linéaire entre les marqueurs oxydant et les paramètres du sperme	121
Figure 65: Régression linéaire entre les marqueurs oxydants et le fructose, la FSH et l'Inhibine B.	122

RESUME

L'exploitation des données relatives à la situation sanitaire des populations, à travers le monde, et leur importance dans la mise au point des protocoles et des stratégies de prise en charge et de prévention font actuellement l'objet d'un grand intérêt. Au Cameroun, l'augmentation de la prévalence de l'infertilité masculine se poursuit de façon notable ; elle est la conséquence d'un changement radical dans le mode de vie des citoyens et une baisse des paramètres spermatiques au fil des années. L'objectif de notre étude était de rechercher les anomalies spermatiques responsables des infertilités masculines à Yaoundé et leurs étiologies épidémiologiques et biochimiques.

Nous avons réalisé une étude transversale, Cas-Témoin, et multicentrique auprès de 240 hommes suivis dans des établissements publics et privés de santé de la ville de Yaoundé. Après l'obtention du consentement éclairé et recueil des données épidémiologiques (données sociodémographiques, l'histoire de la fertilité personnelle et familiale des patients, leurs antécédents médicaux et chirurgicaux, leur sexualité, et les habitudes alimentaires et comportementales), nous avons par la suite réalisé des analyses biologiques tant sur le sérum que sur le sperme. La spermoculture et le spermogramme ont été réalisés suivant le Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale (GBEA). Le dosage des hormones (FSH et Inhibine B) a été fait par des méthodes Immuno-enzymatiques, celui du fructose et des marqueurs du stress par le biais de méthodes colorimétriques et cinétiques ; quant au dépistage des infections à Chlamydia, Mycoplasme, Syphilis, VIH, hépatite B, hépatite C, ils ont été faits par des méthodes tant Immuno-chromatographiques que Immuno-enzymatiques. A l'issue de ces études, les données ont été codées et saisies dans Excel 2016, puis analysées à l'aide du logiciel XLSTAT 2020. Le travail a reçu l'approbation du comité national d'éthique de la recherche en santé humaine du Cameroun sous la référence 2015/04/572/CE/CNERSH/SP.

L'approche épidémiologique montre que l'infertilité secondaire était le motif de consultation le plus prépondérant (55%) dans notre population et la situation matrimoniale majoritaire était celle de marié. La majorité de nos patients avaient un âge avancé de paternité ($37,1 \pm 7,37$ ans) et un IMC moyen de $25,26 \pm 6,8$ kg/m². L'étude de l'association entre l'infertilité et les facteurs de risque conforte des notions classiques. En effet, l'infertilité masculine semble

fortement liée à la cryptorchidie, les oreillons, la varicelle, la varicocèle, une chirurgie abdominale/pelvienne et l'ablation d'un testicule (Odds ratio (OR)>1). S'agissant des comportements à risque et des habitudes alimentaires, les plus prédisposant pour l'infertilité étaient le téléphone dans la poche du pantalon, l'utilisation de l'ordinateur sur les genoux, le port de vêtements serrés, la grande consommation de Fast-Foods, de sucreries et d'aliments gras (OR>1). La prévalence des anomalies spermatiques était élevée dans notre population d'étude (64,86%). Comparé aux témoins, les Cas avaient des valeurs plus faibles concernant le volume ($p>0,05$), la concentration en spermatozoïdes ($p < 0, 0001$), le nombre total de spermatozoïdes ($p < 0, 0001$), la mobilité progressive ($p < 0, 0001$), la vitalité ($p < 0, 0001$) et le pourcentage total de formes normales ($p > 0,05$). De plus, ils avaient des valeurs plus élevées de pH ($p = 0,020$) et la viscosité ($p>0,05$). Environ 67% des Cas cumulaient plusieurs anomalies spermatiques et l'association la plus fréquente étant la combinaison Oligospermie+Asthénospermie+Nécrospermie. Les antécédents cliniques, chirurgicaux, la profession, les comportements à risque avaient été significativement associés à une baisse de la numération des spermatozoïdes (OR>1). L'évaluation des différents paramètres biochimiques indiquent que la grande majorité de la population avait un taux normal de fructose ($>13\mu\text{M}/\text{éjaculat}$). Comparé aux témoins, le groupe de Cas avait un taux significativement supérieur de fructose ($p=0,004$). Ainsi donc, dans notre population, les anomalies du spermogramme n'étaient pas dues à un déficit en fructose et celui-ci était un bon indicateur de la baisse de la concentration en spermatozoïdes. L'évaluation des concentrations sériques en Inhibine B et FSH indique que les Cas avaient des concentrations plus faibles d'Inhibine B ($p= 0,216$) et plus élevées de FSH ($p=0,964$). L'inhibine B était positivement corrélée au pourcentage de formes normales, la concentration en spermatozoïdes et au volume et négativement corrélée à la vitalité, la mobilité, la viscosité et le pH. La FSH quant à elle était positivement corrélée au Pourcentage de formes normales, au volume et au pH ; elle était négativement corrélée à la vitalité, la mobilité, la numération et la viscosité. De plus, l'Inhibine B était négativement corrélée à la FSH ($r= -0,509$; $p<0,0001$). L'évaluation des concentrations des marqueurs oxydants indique que les Cas avaient des concentrations plus faibles en antioxydants notamment, la Catalase ($p=0,880$), le Glutathion réduit ($p=0,558$) et le Glutathion peroxydase ($p<0,0001$) comparé aux témoins. De plus, les concentrations en peroxydes totaux ($p=0,162$), MDA ($p>0,05$), et nitrites ($p=0,899$) étaient plus élevées dans le groupe de Cas comparé aux témoins. Le volume, la numération, la vitalité, la mobilité et le pourcentage de formes normales étaient positivement corrélés aux marqueurs antioxydants. S'agissant des marqueurs oxydants, le MDA et les peroxydes totaux étaient négativement

corrélés aux paramètres du sperme. Exception faite de la FRAP, le fructose était inversement proportionnel aux marqueurs antioxydants. Quant aux hormones Inhibine B et FSH, nous avons observé des corrélations inverses et opposées vis-à-vis des marqueurs antioxydants. En effet, l’Inhibine B étaient positivement corrélée au Glutathion peroxydase, à la Catalase et la SOD et négativement corrélée au Glutathion réduit, la FRAP et la vitamine E.

Nous pouvons conclure que la qualité du sperme de nos patients est en décroissance dans notre population d’étude. Cette diminution est la conséquence d’un changement radical dans le mode de vie constaté chez les citoyens. Elle est également la conséquence d’autres facteurs énoncés dans ce travail. Cependant, leurs effets négatifs peuvent être surmontés dans une large mesure par la modification du comportement, un diagnostic précoce des anomalies spermatiques et une prise en charge assidue des infections et du déséquilibre des marqueurs du stress oxydatif.

Mots clés : Anomalies spermatiques, Infertilité masculine, Epidémiologie, Biochimie du sperme, stress oxydatif, Yaoundé.

SUMMARY

The use of data relating to the health situation of populations around the world and their importance in the development of protocols and strategies for treatment and prevention are currently the subject of great interest. In Cameroon, the increase in the prevalence of male infertility continues to markedly. It is the consequence of a radical change in the way of life of citizens and a decline in sperm parameters over the years. The objective of this study was to determine the frequency of sperm abnormalities responsible for male infertility in Yaoundé and their epidemiological and biochemical etiologies.

An analytical cross-sectional study with a control group, and multicenter carried out among 240 men followed-up in public and private health establishments in the city of Yaoundé. Patients were recruited from three public hospitals (Yaoundé Central Hospital, Yaoundé Hospital and University Center, Yaoundé General Hospital) and three private laboratories in the city of Yaoundé (Bethanie Laboratory, Center Medical Analysis Laboratory and GTAB Laboratory). After obtaining informed consent and completing the questionnaire, we subsequently performed biological analyzes on both the serum and the semen. The blood and semen samples, as well as the sperm culture and the spermogram were carried out according to the Guide for the Good Execution of Medical Biology Analyzes (GBEA). The assay of fructose, FSH and Inhibin B hormones, screening for Chlamydia, Mycoplasma, Syphilis, HIV, hepatitis B, hepatitis C infections and the assay of stress markers was done using Enzyme Immunoassay, Immuno -chromatographic, colorimetric and kinetic. At the end of these studies, the data were coded and entered in Excel 2013, then analyzed using the XLSTAT 2014 software. The work received the approval of the national ethics committee for research in human health. Cameroon under the reference 2015/04/572 / CE / CNERSH / SP.

The epidemiological approach shows that secondary infertility was the most prominent reason for consultation (55%) in our population and the majority marital status was that of married. The majority of our patients had an advanced age of paternity (37.1 ± 7.37 years) and a mean BMI of 25.26 ± 6.8 kg / m². The study of the association between infertility and risk factors supports conventional notions. Indeed, male infertility appears to be strongly linked to cryptorchidism, mumps, chickenpox, varicocele, abdominal / pelvic surgery and testis removal (OR > 1). Regarding risk behaviors and eating habits, the most predisposing to

infertility were the phone in the pocket of the pants, the use of the computer on the knees, the wearing of tight clothes, the heavy consumption of Fast -Foods, sweets and fatty foods (OR> 1). The prevalence of sperm abnormalities is high in our population (64.86%). Cases had lower values for volume ($p > 0.05$), sperm concentration ($p < 0, 0001$), total sperm count ($p < 0, 0001$), progressive mobility ($p < 0, 0001$), vitality ($p < 0, 0001$) and the total percentage of normal forms ($p > 0.05$). They had higher values of pH ($p = 0.020$) and viscosity ($p > 0.05$). About 67% of cases had multiple sperm abnormalities, the most common association being the combination of Oligospermia + Asthenospermia Necrospermia. Clinical history, surgery, occupation, risk behaviors were significantly associated with a decrease in sperm count (OR> 1). Evaluation of the various biochemical parameters indicates that the vast majority of the population had a normal level of fructose ($> 13\mu\text{M}$ / ejaculate). Compared to controls, the Case population had a significantly higher level of fructose ($p = 0.004$). In our population, the abnormalities in the spermogram were not due to a fructose deficiency. Assessment of serum Inhibin B and FSH concentrations indicated that Case had lower concentrations of Inhibin B ($p = 0.216$) and higher concentrations of FSH ($p = 0.964$). Inhibin B was positively correlated with percent normal forms, sperm concentration and volume, and negatively correlated with vitality, mobility, viscosity, and pH. FSH, on the other hand, was positively correlated with Percent of normal forms, volume and pH; it was negatively correlated with vitality, mobility, count and viscosity. In addition, Inhibin B was negatively correlated with FSH ($r = -0.509$; $p < 0.0001$). The evaluation of the concentrations of oxidative markers indicates the cases had lower concentrations of antioxidants including Catalase ($p = 0.880$), reduced Glutathione ($p = 0.558$) and Glutathione peroxidase ($p < 0.0001$) compared to controls. In addition, the concentrations of total peroxides ($p = 0.162$), MDA ($p = 1$), and nitrites ($p = 0.899$) were higher in the Case group compared to controls. Volume, count, vitality, mobility and percentage of normal forms were positively correlated with antioxidant markers. Regarding oxidative markers, MDA and total peroxides were negatively correlated with semen parameters. With the exception of FRAP, fructose was inversely proportional to antioxidant markers. As for the hormones Inhibin B and FSH, we observed inverse and opposite correlations with respect to antioxidant markers. Indeed, Inhibin B was positively correlated with Glutathione Peroxidase, Catalase and SOD and negatively correlated with Reduced Glutathione, FRAP and Vitamin E.

We can conclude that the quality of the sperm of our patients is decreasing. This decrease is the consequence of a radical change in the way of life observed among citizens. It is also the

consequence of a plethora of other factors set out in this work. However, their negative effects can be overcome to a large extent by behavior modification, early diagnosis of sperm abnormalities, and careful management.

Keywords: Sperm abnormalities, Male infertility, Epidemiology, Biochemistry of the semen, oxidative stress, Yaoundé.



Introduction et problématique

Des études ont indiqué qu'il existe une pléthore de facteurs qui influent sur le modèle de fécondité d'une population, directement ou indirectement (Chandiok et *al.*, 2016). L'âge au mariage, l'âge à la première conception, et le nombre de conceptions et de naissances vivantes sont quelques-uns des facteurs biologiques qui déterminent la fertilité. En revanche, le statut scolaire, le statut professionnel, le revenu annuel par ménage par habitant, le type de famille et l'utilisation des mesures de contrôle des naissances sont les facteurs sociaux qui influent sur la fécondité d'une population (Chandiok et *al.*, 2016). Les facteurs liés au mode de vie associés à l'infertilité masculine sont le tabagisme, la consommation d'alcool, l'usage de drogues illicites, l'obésité, le stress psychologique, l'âge paternel avancé, les pratiques alimentaires et la consommation de café (Durairajanayagam et *al.*, 2018). D'autres facteurs tels que le stress thermique testiculaire, l'entraînement intensif au cyclisme, le port de vêtements serrés, le manque de sommeil et l'exposition au rayonnement électromagnétique du téléphone mobile peuvent également être pris en considération (Durairajanayagam et *al.*, 2018).

Les cellules spermatogéniques sont également très sensibles aux facteurs environnementaux (Huang et *al.*, 2015). Ces facteurs comprennent non seulement des facteurs physiques et chimiques, mais aussi des infections microbiennes du système reproducteur mâle (Schagdarsurengin et *al.*, 2016 ; Alshahrani et *al.*, 2013). Dans la clinique, certains agents pathogènes, tels que *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, Herpes virus simplex, sont fortement liés à l'infertilité masculine (Mor et *al.*, 2015 ; Gimenes et *al.*, 2014). Des études ont montré qu'environ 15% des troubles de fertilité masculine sont des résultats de l'infection et de l'inflammation du système masculin (Autilio et *al.*, 2015). Le microenvironnement inflammatoire résultant des infections microbiennes peut induire une spermatogénèse anormale menant à l'infertilité (Autilio et *al.*, 2015).

L'infertilité a longtemps été considérée comme un problème d'origine féminine en Afrique ; par conséquent, très peu d'efforts ont été déployés pour identifier la responsabilité masculine dans les couples infertiles (Momo et *al.*, 2019). De nombreuses études (Abarikwu, 2013 ; Jungwirth et *al.*, 2012 ; Araoye et *al.*, 2003) ont montré que, dans 50% des couples involontairement sans enfant, les paramètres anormaux de sperme indiquent un facteur infertilité masculine associé. Au Cameroun, Nana et *al.*, ont rapporté que les lésions des spermatozoïdes étaient responsables de l'infertilité chez 41,7% des hommes infertiles dans les services d'urologie de l'hôpital central de Yaoundé (Momo et *al.*, 2019).

La responsabilité de l'homme est confirmée par les examens spermiologiques qui sont le spermogramme et le spermocytogramme (Ounis et *al.*, 2015). Selon l'OMS, ce sont des examens clés dans l'exploration de l'infertilité du couple. L'altération de la qualité du sperme, observée depuis plusieurs décades, soulève le problème du déclin de la fertilité des hommes. Les causes d'infertilité masculine sont variées et souvent multifactorielles, se traduisant dans 61 % des cas par une anomalie quantitative et/ou qualitative du sperme (Ounis et *al.*, 2015). L'analyse cytomorphologique du sperme revêt une grande importance dans l'exploration de l'infertilité masculine tant sur le plan diagnostique en guidant la recherche étiologique mais également sur le plan thérapeutique en jouant un rôle significatif dans le conditionnement des résultats de la fécondation assistée, confortant ainsi encore plus la place occupée par l'infertilité masculine liée aux anomalies morphologiques des spermatozoïdes dans l'étude de la reproduction humaine et des difficultés qu'elle rencontre.

Les causes de l'infertilité chez l'homme sont relativement bien identifiées notamment dans les pays développés, mais le sont beaucoup moins dans les pays en voie de développement. Les mécanismes à l'origine de la baisse de qualité du sperme sont complexes, multifactoriels et intriqués. Les travaux récents s'accordent pour considérer que la perturbation de certains marqueurs biochimiques occupe ici une place importante (Marzec-Wróblewska et *al.*, 2012).

Les métabolites présents dans le plasma séminal (acides aminés, peptides, vitamines, minéraux, lipides, hydrocarbures) jouent plusieurs rôles liés à la fonction du sperme, tels que la production d'énergie, la motilité, la protection, le contrôle du pH et la régulation de l'activité métabolique (Bieniek et *al.*, 2016).

Le fructose est la source d'énergie primaire pour les spermatozoïdes et les glucides majeurs dans le plasma séminal. Le fructose est produit dans les vésicules séminales, sous la stimulation androgénique (Juyena et *al.*, 2012), et trouvé dans le plasma séminal de plusieurs espèces. Certains auteurs notamment Nguyen et *al.* (2018) ont montré qu'une augmentation de la concentration de spermatozoïdes s'accompagne souvent d'une diminution de la concentration de fructose dans le plasma séminal, car les spermatozoïdes utilisent le fructose comme principale source d'énergie.

Les plus récentes études, cherchant à expliquer les énigmes des altérations morphologiques et de la baisse de la mobilité des spermatozoïdes, ont montré que les cellules germinales masculines sont sensibles à plusieurs facteurs de l'environnement (Marzec-Wróblewska et *al.*,

2012). Ces facteurs peuvent rendre l'oxygène, molécule initialement inerte et indispensable aux processus énergétiques des spermatozoïdes, une molécule toxique conduisant à la formation de radicaux libres oxygénés appelés « espèces réactives de l'oxygène » (ERO). Une augmentation de la quantité des radicaux libres et/ou une diminution des composés antioxydants sont responsables d'un trouble connu sous le nom de stress oxydatif.

Les spermatozoïdes, comme toute cellule vivante, se défendent contre ce stress. Ces cellules sont équipées de systèmes antioxydants tels que les enzymes antioxydantes (superoxyde, dismutase, glutathion peroxydase...) (Murawski et *al.*, 2007 ; Hall et *al.*, 1998 ; Marklund et *al.*, 1974) et les éléments trace (zinc, sélénium...). Ces derniers semblent jouer un rôle très important dans la fertilité masculine car ils constituent des cofacteurs des enzymes antioxydantes et interviennent dans l'intégrité structurale des spermatozoïdes (Colagar et *al.*, 2009).

La qualité du sperme dépend d'une spermatogénèse normale, qui se compose de trois phases : l'auto-renouvellement des cellules souches spermatogonielles et la différenciation, la division méiotique des spermatocytes et la spermiogénèse. L'évaluation de la spermatogénèse joue donc un rôle central lors de l'investigation d'une baisse de la qualité du sperme. L'analyse de sperme est un marqueur classique, tandis que la biopsie testiculaire est effectuée pour déterminer la cause des anomalies spermatiques, de l'affaiblissement testiculaire ou d'un désordre obstructif (Manzoor et *al.*, 2012). Les hormones jouent un rôle vital dans l'initiation et le maintien de la fonction reproductrice masculine (Meecker et *al.*, 2007). Des études antérieures ont rapporté que les niveaux circulants des hormones reproductrices spécifiques chez les hommes sont associés aux paramètres de qualité de sperme (Mahmoud et *al.*, 1998; Jensen et *al.*, 1997; Subhan et *al.*, 1995; Sina et *al.*, 1975). L'évaluation endocrinienne comprend la mesure de la testostérone sérique, de l'hormone de stimulation du follicule (FSH) et de l'hormone lutéinisante (LH). Toutefois, ces hormones ont leurs limites diagnostiques. Le besoin d'un marqueur additionnel plus précis de spermatogénèse s'est fait ressentir. Récemment l'inhibine B (décrite en 1932 par Mc Cullagh) a émergé comme marqueur sensible et spécifique de la fertilité masculine (Manzoor et *al.*, 2012 ; Krause et *al.*, 2002).

Elle est produite par les cellules de Sertoli des tubules séminifères chez les hommes (Tyrrell et *al.*, 1994) et est également présent dans les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides précoces (Krause et *al.*, 2002). L'Inhibine B régule la sécrétion de FSH dans un feedback négatif (Anderson et *al.*, 2000). Elle agit comme un « messager » des testicules,

inhibant la sécrétion FSH de l'hypophyse lorsque la production de spermatozoïdes a été suffisamment stimulée, reflétant la réponse testiculaire à l'activité de la *hypothalamicpituitary-gonadal hormon* (HPG) (Anderson et *al.*, 2000). La production d'inhibine B dépend à la fois de la FSH et du statut spermatogénique. (Meachem et *al.*, 2001). En particulier, l'inhibine B et FSH sont considérés comme des marqueurs de la spermatogénèse et la fonction cellulaire Sertoli, et il a même été suggéré que la mesure des deux hormones dans le sérum pourrait servir de substitut pour mesurer la qualité du sperme ou la fécondité en épidémiologie (Mabeck et *al.*, 2005 ; Uhler et *al.*, 2003; Pierik et *al.*, 1998; Jensen et *al.*, 1997).

L'infertilité est un problème d'importance pour la santé publique au Cameroun et dans de nombreux autres pays en développement en raison de sa forte prévalence et de ses graves implications sociales sur les couples et les familles touchées (Abarikwu, 2013). Les implications pour la santé publique sont encore plus grandes si l'on considère que ces affections représentent la conséquence d'autres problèmes de maladie, dont chacun peut présenter des risques supplémentaires pour la santé personnelle des deux couples et imposer des charges supplémentaires au service de santé (Okonofua et *al.*, 2003). En outre, l'infertilité entraînant le dépeuplement de certaines régions, limite le développement social et l'économique d'une région. Lorsque les efforts déployés par des couples infertiles échouent, les sentiments d'impuissance, de frustration et de désespoir sont fréquents.

L'infertilité masculine est donc un sujet de grave préoccupation en Afrique, en général, et au Cameroun, en particulier. Il est maintenant généralement admis que l'infertilité masculine est tout aussi importante que le facteur féminin (Abarikwu, 2013). Jusqu'à présent, les autorités ont fait peu d'efforts pour remédier à la situation (Momo et *al.*, 2019).

Cette étude vise à améliorer la qualité des informations disponibles pour les cliniciens pour une meilleure prise en charge des cas d'infertilité masculine dans notre contexte Camerounais.

Pour se faire nous avons abordé des aspects épidémiologiques, cytologiques et biochimiques du problème.

Hypothèse de recherche

La baisse de la qualité du sperme est liée à une perturbation des marqueurs biochimiques et épidémiologiques.

Objectifs de recherche

Objectif général

Identifier les anomalies spermatiques responsables des infertilités masculines à Yaoundé et leurs étiologies épidémiologiques et biochimiques.

Objectifs spécifiques

- Caractériser les facteurs déterminants de l'infertilité masculine dans notre population,
- Déterminer la fréquence des différentes anomalies spermatiques
- Identifier les différentes étiologies biochimiques responsables d'anomalies spécifiques

Chapitre I :

Revue de la littérature

I. Revue de la littérature

I.1 Quelques définitions

Fertilité : Elle désigne l'aptitude d'un couple à procréer. (Houssein et *al.*, 2017)

Infertilité : c'est l'absence de conception après au moins douze mois de rapports sexuels non protégés, ces rapports doivent être normaux en fréquence et en qualité à l'intérieur d'un couple vivant régulièrement ensemble (OMS, 2010; Rowe et *al.*, 2000).

On décrit deux types d'infertilité masculine :

Infertilité masculine primaire: Ce terme est utilisé lorsqu'un homme n'a jamais fécondé une femme, féconder signifie que la conception a eu lieu, indépendamment de l'évolution de la grossesse (Comhaire et *al.*, 1998).

Infertilité masculine secondaire : Ce terme est utilisé lorsqu'un homme a fécondé une femme, indépendamment du fait qu'elle soit la partenaire actuelle, et indépendamment de l'évolution de la grossesse (Comhaire et *al.*, 1998).

Hypofertilité : Elle est définie par une difficulté à concevoir, se traduisant par un allongement du délai nécessaire pour qu'une grossesse débute chez un couple donné, appelé « délai de conception ». (Houssein et *al.*, 2017)

Stérilité masculine est définie par l'incapacité totale et définitive de concevoir, à cause d'une étiologie évidente et non curable d'infertilité . (Spira et *al.*, 1986).

Déterminants de la santé : facteurs qui influencent l'état de santé d'une population soit isolément soit en association avec d'autres facteurs.

Facteurs de risque: éléments augmentant la probabilité de développer une maladie ou de souffrir d'un traumatisme.

I.2 Spermatozoïde, Spermatogenèse, Sperme

I.2.1 Origine du spermatozoïde (Ammar-Keskes et *al.*, 2013)

La production de spermatozoïdes est assurée après la puberté par les testicules au niveau des tubes séminifères. La spermatogenèse s'effectue dans l'épithélium séminal et aboutit à la formation à partir de cellules germinales somatiques, les spermatogonies, aux spermatozoïdes. Les spermatozoïdes sont des cellules haploïdes pourvues d'une tête de petite taille contenant le noyau et l'acrosome et d'une queue, mobile, épaisse dans sa partie proximale et effilée dans sa partie terminale.

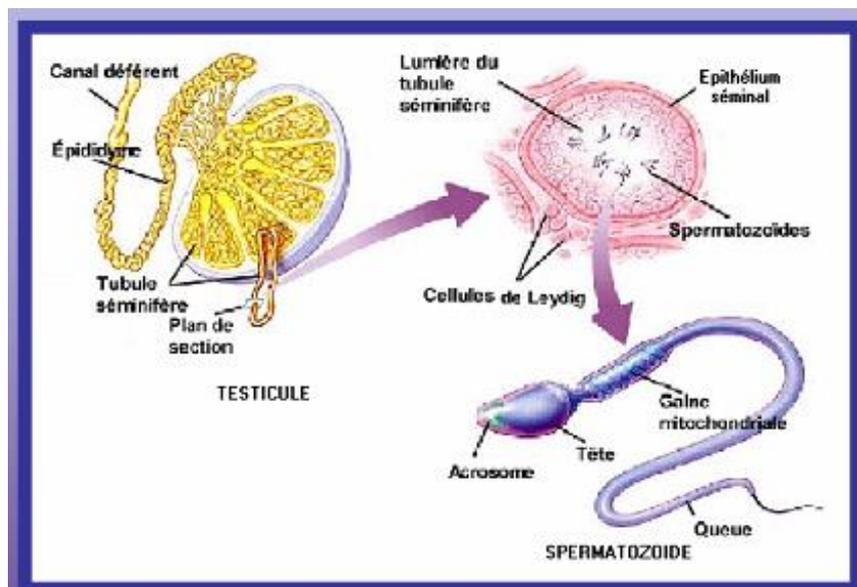


Figure 1: Origine du spermatozoïde. (Ammar-Keskes et *al.*, 2013)

I.2.2 Ultrastructure du spermatozoïde (Ammar-Keskes et *al.*, 2013)

En coupe longitudinale, la tête du spermatozoïde a une forme de poire. Le noyau occupe la partie postérieure et large de la tête. Sa chromatine est dense. L'acrosome forme un sac recouvrant les deux tiers antérieurs du noyau. Il est limité par une membrane propre et comporte deux parties d'épaisseur inégale. Le contenu acrosomal est homogène et dense. La queue commence par la pièce intermédiaire qui comporte la gaine mitochondriale, entourant l'axonème et les fibres denses. Dans la partie principale du flagelle, l'axonème est entouré d'une gaine fibreuse dense aux électrons qui s'arrête dans la partie terminale; celle-ci renferme seulement l'axonème, réduit au niveau de l'extrémité à quelques microtubules isolés.

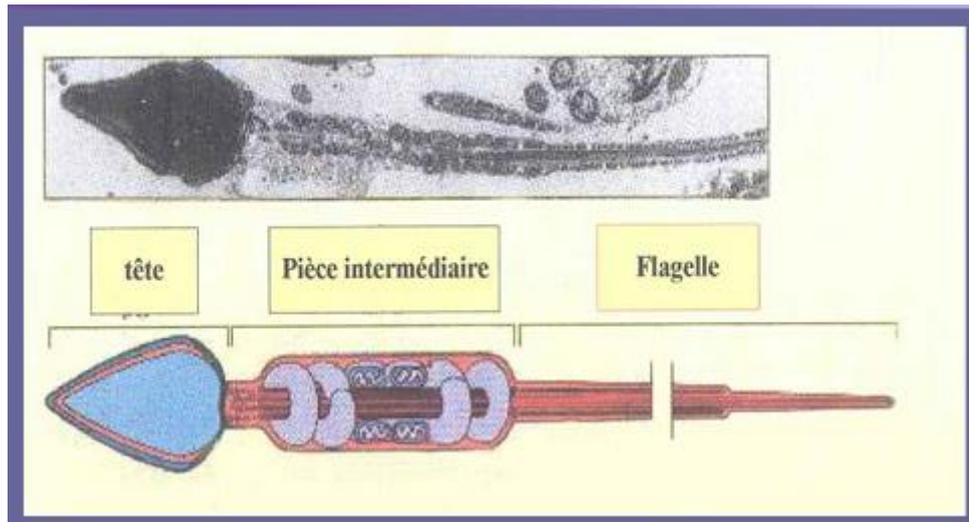


Figure 2: Ultrastructure du spermatozoïde. (Ammar-Keskes et *al.*, 2013)

I.2.3 La spermatogénèse (Ammar-Keskes et *al.*, 2013)

La spermatogénèse comporte une étape de multiplication des spermatogonies situées à la partie basale de l'épithélium séminal. Ces cellules donnent naissance après mitose aux spermatocytes I qui doublent leur capital d'ADN et entrent en prophase de la première division réductionnelle de la méiose. Celle-ci aboutit à la formation des spermatocytes II, de taille plus faible et qui donnent rapidement à l'issue de la deuxième division équationnelle, deux cellules rondes et haploïdes, les spermatides.

Les spermatides, situées dans la partie haute de l'épithélium séminal se différencient en spermatozoïdes au cours de la spermiogénèse.

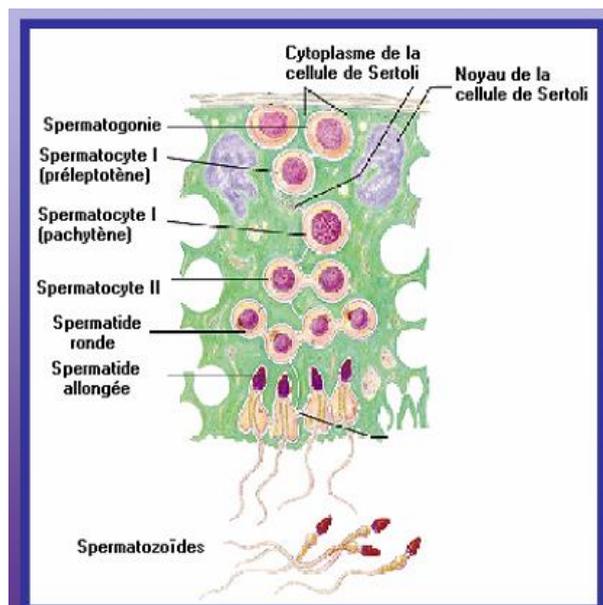


Figure 3: la spermatogénèse. (Ammar-Keskes et *al.*, 2013)

I.2.4 Etapes de la spermiogénèse (Ammar-Keskes et *al.*, 2013)

La spermiogénèse est le processus de différenciation des spermatides qui correspond à un ensemble de modifications cellulaires sans division cellulaire, aboutissant à la mise en place dans la cellule d'une tête et d'un flagelle. Elle est habituellement résumée en cinq phases qui chevauchent dans le temps:

- Formation de l'acrosome à partir du Golgi.
- Formation du flagelle à partir du centre cellulaire.
- Formation du manchon mitochondrial.
- Elimination des restes cytoplasmiques.
- Condensation du noyau

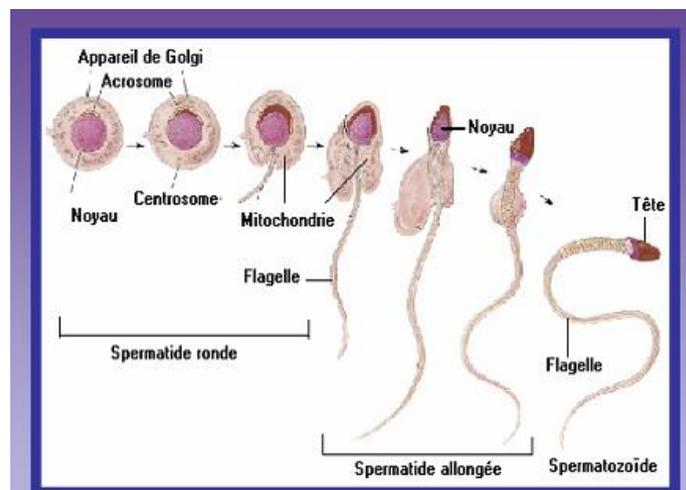
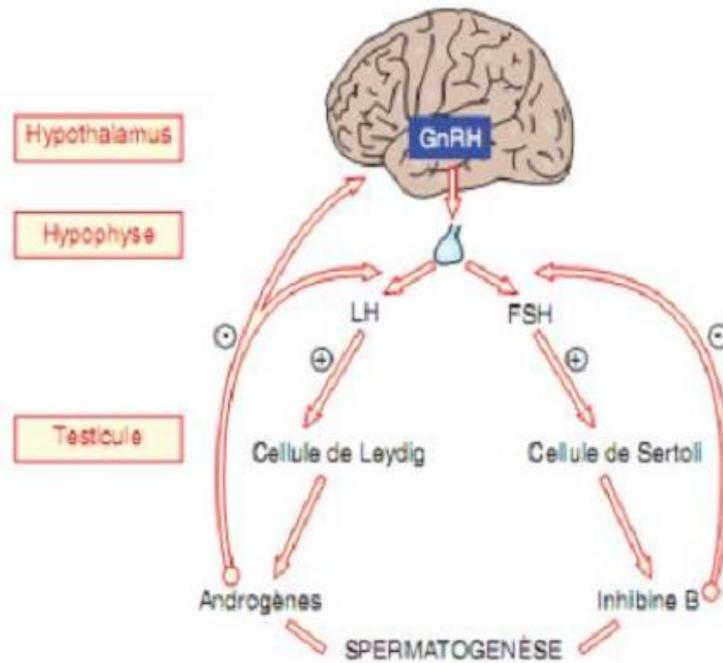


Figure 4: Les étapes de la spermiogénèse. (Ammar-Keskes et *al.*, 2013)

I.2.5 Contrôle endocrinien de la spermatogénèse. (Houssein et *al.*, 2017)

Le "chef d'orchestre" de la fonction testiculaire est le système hypothalamo-hypophysaire : c'est grâce à l'augmentation de la production pulsatile en période pubertaire du *Gonadotropin Releasing Hormon* (GnRH) par l'hypothalamus, que s'installe la fonction testiculaire. La GnRH provoque la sécrétion pulsatile de deux hormones, la *Folliculin Stimulating Hormon* (FSH) et la *Luteinizing Hormon* (LH) par l'hypophyse.



FSH=*Folliculine Stimulating Hormon* LH=*Luteinizing Hormon* GnRH=*Gonadotropin Releasing Hormon*

Figure 5: Contrôle endocrinien de la spermatogènèse. (Houssein et *al.*, 2017)

I.2.6 Contrôle génétique de la spermatogènèse. (Ammar-Keskes et *al.*, 2013)

La spermatogènèse est sous le contrôle direct du chromosome Y qui contient des gènes spécifiques de la spermatogènèse. Ces gènes sont localisés sur le bras long au niveau d'un locus dénommé *Azoospermia Factor* (AZF). Les mutations touchant les gènes de ce locus sont responsables d'un arrêt ou d'une perturbation majeure de la spermatogènèse. Parmi ces gènes, on note le gène *Deleted in Azoospermia* (DAZ) qui est responsable d'un arrêt de la spermatogènèse et d'une azoospermie sécrétoire.

Il existe actuellement des tests spécifiques pour la mise en évidence des anomalies géniques du chromosome Y; ces tests sont basés sur la technique de polymérisation en chaîne (PCR) qui amplifie des séquences ou marqueurs spécifiques (STS) des gènes étudiés. Les délétions de ces gènes s'expriment par l'absence d'amplification des marqueurs correspondants. Certains autosomes interviennent également dans le déroulement de la spermatogènèse. Les délétions, translocations ou inversions survenant au niveau de ces chromosomes peuvent s'associer à des troubles de la spermatogènèse. Les anomalies de nombre, comme le syndrome de Klinefelter (47, XXY) et la trisomie 21 sont également associées à des anomalies de la spermatogènèse.

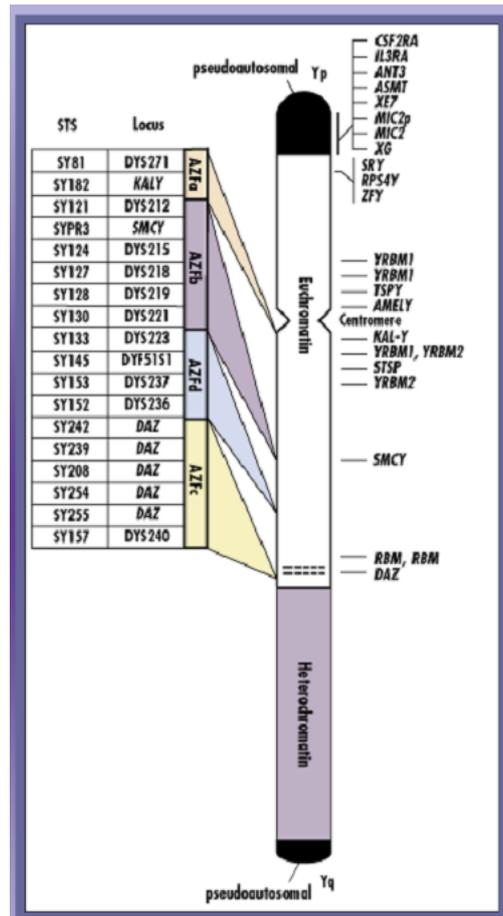


Figure 6: Contrôle génétique de la spermatogenèse. (Ammar-Keskes et *al.*, 2013)

I.2.7 Caractéristiques du sperme éjaculé

Le sperme est un liquide complexe qui se constitue de manière extemporanée au cours de l'éjaculation. Il se compose d'une phase cellulaire (10%), les spermatozoïdes et d'une phase liquide (90%), le plasma séminal. Celui-ci est principalement constitué des sécrétions des vésicules séminales, de la prostate mais aussi des testicules et épидидymes. Un grand nombre de substances ont été trouvées dans le plasma des spermatozoïdes (Vitamine C, B12, Calcium, Magnésium, Phosphore, Potassium, Zinc, fructose, sorbitol, etc...) mais jusqu'à présent, il n'a pas été possible de fournir des preuves de leur importance clinique pour toutes (Ahmed et *al.*, 2010). À la lumière des connaissances les plus récentes, le fructose occupe la place la plus importante dans les recherches biochimiques. En 1945, Mann a identifié le fructose sous forme de méthylphényl-fructosazone. Le fructose agit comme un donneur d'énergie pour les spermatozoïdes, qui le décomposent sélectivement et le convertissent en énergie. La motilité des spermatozoïdes est très étroitement liée à la dégradation du fructose (Ahmed et *al.*, 2010). L'importance du fructose dans le plasma des spermatozoïdes réside dans sa conversion anaérobie en énergie. Le glucose, ainsi que le galactose, sont également présents dans le

liquide séminal, bien que dans une bien moindre mesure. Il a été démontré qu'il existe un rapport défini entre le niveau de fructose et le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat; par conséquent, une augmentation du nombre de spermatozoïdes s'accompagne généralement d'une baisse importante du fructose dans le sperme (Ahmed et *al.*, 2010). À mesure que le nombre de spermatozoïdes augmente, une augmentation des œstrogènes totaux dans le plasma des spermatozoïdes se produit également. Immédiatement après l'éjaculation, le liquide séminal apparaît comme un liquide visqueux, dense, blanchâtre, d'aspect floconneux dont le pH varie entre 7,2 et 8. Dans les 10 à 20 minutes suivant l'éjaculation, le sperme se liquéfie sous l'action de plusieurs enzymes protéolytiques d'origine testiculaire et prostatique. En plus des spermatozoïdes, le sperme comporte aussi une faible quantité de cellules rondes correspondant à des cellules immatures de la lignée germinale, quelques cellules épithéliales desquamées à partir des voies excrétrices, des fragments cellulaires et un nombre variable de polynucléaires.

I.3 Les Mécanismes de l'infertilité masculine (Young et *al.*, 2016)

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

1. Un hypogonadisme hypogonadotrope sévère qui empêche ou interrompt l'activation testiculaire nécessaire à la production de spermatozoïdes : il s'agit là d'une cause dite « pré-testiculaire »;
2. Des maladies primitivement testiculaires altérant le déroulement de la spermatogenèse.
3. Des affections ou lésions empêchant l'évacuation des spermatozoïdes en dehors du testicule, causes dites « post-testiculaires » ou par obstacle.

A côté de ces principaux mécanismes, il existe des infertilités masculines dites « idiopathiques » où l'étiologie est difficile à identifier avec les outils diagnostiques actuels mais qui relèvent possiblement d'un des mécanismes ci-dessus. (Young et *al.*, 2016).

I.3.1 Causes « pré-testiculaires » (Young et *al.*, 2016)

La fertilité masculine suppose qu'un homme soit capable à la fois de produire des spermatozoïdes et d'avoir une vie sexuelle normale. Ces deux conditions dépendent de l'intégrité des fonctions testiculaires endocrine et exocrine, contrôlées par les gonadotrophines hypophysaires.

La fonction testiculaire endocrine comprend la synthèse des stéroïdes sexuels par les cellules de Leydig. Elle est responsable, à partir de l'âge de la puberté, de la virilisation (développement adulte de la verge et masculinisation en général) et de l'apparition du désir sexuel (libido). La synthèse de testostérone est sous la dépendance de la gonadotrophine hypophysaire LH. La fonction exocrine assure la production de spermatozoïdes matures. Elle a lieu dans le tube séminifère sous la dépendance obligatoire et concomitante des deux gonadotrophines hypophysaires. La FSH stimule directement la cellule de Sertoli (CS) mais LH agit aussi sur la CS : elle le fait de manière indirecte en stimulant la production locale de testostérone qui agit, de façon paracrine, sur le récepteur aux androgènes exprimé dans les CS. Cette double influence hormonale entraîne une prolifération puis une maturation des CS (Trabado et *al.*, 2014). Les CS stimulées vont à leur tour déclencher la production locale de messagers qui activent, par un mécanisme paracrine, la lignée germinale. Grâce à cette double stimulation hormonale (FSH+LH), se met en place la multiplication et le renouvellement des cellules souches (spermatogonies) puis leur différenciation en spermatocytes qui les conduit successivement aux divisions méiotiques puis à la différenciation terminale en spermatozoïdes matures (spermiogenèse) et enfin à leur excrétion dans la lumière des tubes séminifères (spermiation) (Griswold et *al.*, 2016). On comprend ainsi que tout déficit profond en gonadotrophines hypophysaires, quelle qu'en soit la cause (Tableau I), puisse à la fois être responsable d'un hypogonadisme et d'une infertilité par interruption de la production testiculaire de spermatozoïdes (Boehm et *al.*, 2015; Salenave et *al.*, 2012 ; Young et *al.*, 2012). Parmi ces nombreuses causes, signalons tout particulièrement, le dopage, par utilisation de testostérone et/ou de stéroïdes anabolisants chez les sportifs ou les « bodybuilders ». Ces stéroïdes inhibent, par rétrocontrôle négatif, les gonadotrophines hypophysaires conduisant à une azoospermie avec hypotrophie testiculaire en cas d'utilisation prolongée et à fortes doses. Hormis ces cas de dopage, les hypogonadismes hypogonadotropes peuvent être diagnostiqués par la baisse simultanée de la testostérone et des gonadotrophines LH et FSH (Boehm et *al.*, 2015; Salenave et *al.*, 2012 ; Young et *al.*, 2012).

Tableau I: Etiologie des hypogonadismes hypogonadotrophiques congénitaux (HHC) et acquis (HHA) responsables d'infertilité par atteinte pré-testiculaire. (Young et al., 2016)

<p>Hypogonadismes hypogonadotrophes congénitaux (HHC)</p> <ul style="list-style-type: none"> • HHC normosmique isolé <ul style="list-style-type: none"> - Mutations de <i>GNRH1</i>, <i>GNRHR</i>, <i>KISS1</i>, <i>KISS1R</i>, <i>TAC3</i>, <i>TACR3</i> • Syndrome de Kallmann (= HHC + anosmie/hyposmie) <ul style="list-style-type: none"> - Mutations de <i>KAL1</i> (<i>ANOS1</i>), <i>FGFR1</i>, <i>FGF8</i>, <i>PROK2</i>, <i>PROKR2</i>, <i>WDR11</i>, <i>CHD7</i>, <i>SEMA3A</i>, <i>SOX10</i>, <i>FEZF1</i>, <i>IL17RD</i>, <i>FGF17</i> • Hypopituitarisme congénital (interruption de tige et autres...)
<p>Hypogonadismes hypogonadotrophes acquis (HHA)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumeurs de la région hypothalamo-hypophysaire <ul style="list-style-type: none"> - Crâniopharyngiome - Adénomes hypophysaires - Dysgerminomes, gliomes • Processus infiltratifs hypothalamo-hypophysaires <ul style="list-style-type: none"> - Hémochromatose juvénile et post transfusionnelle - Hypophysite ou infundibulite - Sarcoïdose - Histiocytose • Iatrogéniques et traumatiques <ul style="list-style-type: none"> - Chirurgie de la région hypothalamo-hypophysaire - Radiothérapie hypophysaire ou encéphalique - Traumatisme crânien • Fonctionnels <ul style="list-style-type: none"> - Hyperprolactinémie - Carence nutritionnelle (anorexie mentale, maladies chroniques, activité physique excessive) - Hypercortisolisme, tumeurs féminisantes - Causes médicamenteuses (androgènes, anabolisants, oestroprogestatifs, agonistes de la GnRH, corticoïdes) - Bloc en 21 hydroxylase avec sécrétion excessive de progestérone et de 17-OH-progestérone

I.3.2 Causes testiculaires

La production quantitativement et qualitativement normale de spermatozoïdes à partir des cellules souches spermatogoniales est aussi, indépendamment de sa régulation hormonale, un processus extrêmement complexe et vulnérable (Salenave et al., 2012).

Des maladies très nombreuses et variées peuvent l'affecter (Tableau II). La spermatogenèse fait intervenir l'expression testiculaire d'un nombre considérable de gènes dont seule une poignée est à ce jour connue pour être impliquée comme cause génétique de certaines infertilités masculines (Krausz et al., 2015; Salenave et al., 2012). Des mutations ou des délétions de certains de ces gènes peuvent ainsi être responsables d'une altération de la spermatogenèse suite à une interruption d'une ou de plusieurs étapes de la cascade conduisant à la formation d'un spermatozoïde haploïde à partir d'une spermatogonie diploïde. Parmi les anomalies génétiques les plus fréquentes et les mieux connues sont les micro-délétions du bras long du chromosome Y (Figure 1) qui sont trouvées chez plus de 10% des hommes avec

azoospermie non obstructive et chez près de 5% des hommes avec oligospermie extrême (Krausz et *al.*, 2015 ; Krausz et *al.*, 2014; Sadeghi-Nejad et *al.*, 2008 ; Pryor et *al.*, 1997). Ces microdélétions entraînent des pertes, plus ou moins importantes, de la région située en Yq11 appelée AZF (pour Azoospermia Factor) (Figure 1). Dans cette région sont situés 3 locus appelés AZFa (comprenant les gènes USP9Y et DBY/DDX3Y), AZFb et AZFc où se trouvent de nombreuses séquences d'ADN répétées qui prédisposent à la survenue de délétions (Krausz et *al.*, 2015; Krausz et *al.*, 2014; Sadeghi-Nejad et *al.*, 2008; Pryor et *al.*, 1997).

Celles-ci entraînent la perte d'un nombre variable de gènes nécessaires à la production des spermatozoïdes. Les micro-délétions les plus fréquentes concernent la région AZFc. Elles toucheraient près d'un homme sur 2300 (Krausz et *al.*, 2015 ; Krausz et *al.*, 2014; Sadeghi-Nejad et *al.*, 2008 ; Pryor et *al.*, 1997). Elles sont à l'origine d'une perte plus ou moins importante des 4 copies du gène DAZ (Delete in AZoospermia) qui sont nécessaires, dans leur ensemble, à la spermatogenèse. D'autres causes monogéniques très rares altérant la spermatogenèse ont été mises en évidence (Tableau II). Citons les exceptionnelles mutations du récepteur de la FSH, découvertes il y a près de 20 ans et qui empêchent la stimulation des cellules de Sertoli par cette gonadotrophine (Tapanainen et *al.*, 1997), ou encore les mutations de TEX11, un gène situé dans le chromosome X et impliqué dans la méiose des cellules germinales (Yatsenko et *al.*, 2015).

La spermatogenèse testiculaire peut être aussi être directement et drastiquement affectée par des anomalies chromosomiques touchant les gonosomes (chromosomes sexuels X ou Y) ou les autosomes (Krausz et *al.*, 2015 ; Plotton et *al.*, 2015; Nieschlag et *al.*, 2014). Ainsi, dans le Syndrome de Klinefelter (SK) le chromosome X surnuméraire induit une altération du renouvellement des cellules souches spermatogoniales et une apoptose des spermatogonies, ce qui provoque une interruption précoce de la spermatogenèse à un stade pré-méiotique (Oates et *al.*, 2012). Le SK est une cause majeure d'infertilité masculine puisque trouvée chez près de 15% des hommes azoospermiques (Ghorbel et *al.*, 2012). Au plan phénotypique, le SK est associé à une hypotrophie testiculaire majeure et parfois à un hypogonadisme avec gynécomastie (Nieschlag et *al.*, 2014). A côté des causes génétiques et chromosomiques, la spermatogenèse peut être affectée considérablement et directement par des agressions physiques, chimiques et infectieuses. Rappelons certaines chimiothérapies anticancéreuses, la radiothérapie touchant la sphère pelvienne/scrotale. Les oreillons, maladie qui émerge à nouveau du fait de la diminution de la couverture vaccinale, peuvent se compliquer d'une orchido-épididymite parfois bilatérale avec comme séquelle, lorsqu'elle survient chez

l'adulte, une altération sévère de la spermatogenèse pouvant aller jusqu'à l'azoospermie et l'atrophie testiculaire (Young et *al.*, 2016). Les traumatismes testiculaires de toute nature (traumatisme scrotal, torsion testiculaire...) peuvent aussi provoquer une altération profonde de la spermatogenèse.

Citons aussi les stérilités consécutives à des orchidectomies pour cancer testiculaire qui posent, de façon aiguë, le problème de la préservation de la fertilité.

La cryptorchidie, qu'elle soit isolée ou dans le cadre plus complexe d'une anomalie globale du développement sexuel, est associée, lorsqu'elle est sévère et bilatérale, à des atteintes partielles (oligospermie) ou complètes (azoospermie) de la spermatogenèse (Virtanen et *al.*, 2015). La cryptorchidie est un symptôme dont les causes peuvent être multiples, associant de façon variable des composantes génétique, développementale et environnementale (Virtanen et *al.*, 2015). On ne sait pas encore clairement si la cryptorchidie est directement responsable de l'altération de la spermatogenèse ou si l'ectopie testiculaire et l'atteinte de la production de spermatozoïdes sont simplement les deux facettes d'une même maladie testiculaire « dysgénétique ».

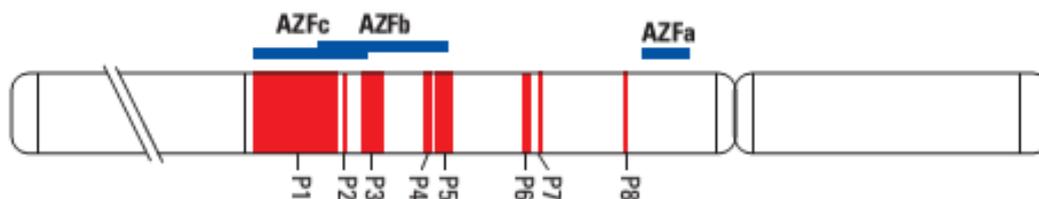


Figure 7: Vision du chromosome Y avec les régions AZF. (Young et *al.*, 2016)

Tableau II: Infertilités masculine par anomalies testiculaire d'origine chromosomique, génétique ou lésionnelle. (Young et *al.*, 2016)

<p>Chromosomiques Klinefelter (XXY) Anomalies du chromosome Y (Y isodicentrique) Hommes XX (<i>SRY</i> + ou -) Translocations et inversions</p>
<p>Génétiques Microdélétions du bras long du chromosome Y (régions <i>AZF</i>) Insensibilité très partielle aux androgènes (MAIS) Mutation du récepteur de la FSH Mutation de <i>TEX11</i></p>
<p>Lésions testiculaires congénitales Cryptorchidie Dysgénésies gonadiques à phénotype masculin</p>
<p>Anomalies qualitatives des spermatozoïdes Globozoospermie Syndrome de Kartagener (cils immobiles) Macrocéphales</p>
<p>Lésions acquises Traumatisme scrotal Orchidectomie Torsion testiculaire Oreillons Orchites infectieuses Radiothérapie Chimiothérapie Inclusions surrénaliennes intra-testiculaires (Bloc 21-hydroxylase classique)</p>
<p>Idiopathiques Oligospermies, oligoa-asthénos-tératospermie</p>
<p>Causes supposées Varicocèle (stade 3) Auto-immunes</p>

I.3.3 Causes « post-testiculaires » par obstacle des voies excrétrices (Young et *al.*, 2016)

Pour pouvoir féconder naturellement un ovocyte expulsé dans les trompes après l'ovulation, les spermatozoïdes produits dans le testicule doivent être mobiles, traverser l'ensemble des voies excrétrices masculines et finalement être déposés dans le vagin après éjaculation lors d'un rapport sexuel (Figure 8).

Après leur libération dans la lumière des tubes séminifères pendant la spermiation, les spermatozoïdes produits convergent vers le rete testis au niveau du hile testiculaire. Ils se dirigent ensuite, via les canaux efférents, vers la tête de l'épididyme où ils confluent vers le canal épидидymaire qui traverse le corps de l'épididyme pour ensuite donner naissance au canal déférent au niveau de la queue de l'épididyme (Figure 8). Les déférents traversent le canal inguinal pour se diriger, au niveau prostatique, vers les canaux éjaculateurs qui naissent après la jonction des vésicules séminales (Figure 8). Au moment de l'éjaculation, l'ensemble du liquide séminal, comprenant les spermatozoïdes et les sécrétions des vésicules séminales et prostatiques est conduit vers l'urètre prostatique après passage dans les canaux éjaculateurs. La fermeture concomitante du sphincter vésical associé à un péristaltisme des muscles lisses assure l'expulsion du liquide séminal vers l'urètre pénien puis à travers l'orifice du méat urétral.

Tout ce cheminement peut être le siège d'obstacles (Tableau III). Ils peuvent être testiculaires: au niveau du rete testis, en cas de processus expansif au niveau du hile testiculaire, comme dans le cas des inclusions surrénaliennes intra-testiculaires observées chez certains hommes porteurs de formes classiques de bloc en 21 hydroxylase (Bry-Gauillard et *al.*, 2014). Une cause majeure d'obstacle post-testiculaire est l'agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD) (Yu et *al.*, 2012). Il s'agit d'une maladie génétique autosomique récessive fréquente (<http://www.cfrscience.com>) liée à des mutations bi-alléliques du gène *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) qui est aussi responsable de la mucoviscidose. Cette dernière maladie qui affecte le poumon, les glandes sudoripares, le tube digestif et le pancréas est provoquée par la présence de 2 mutations sévères de CFTR alors que l'agénésie bilatérale des canaux déférents isolée est la conséquence d'une mutation sévère associée à une mutation mineure de CFTR.

Parmi les obstacles post-testiculaires, il faut citer les ligatures volontaires des déférents pratiquées lors des vasectomies et les ligatures involontaires des déférents lors de chirurgies pour hernie inguinale. Enfin tout processus infectieux des voies excrétrices peut potentiellement entraîner des lésions suivies de séquelles à type obstacle même si leur

prévalence est discutée dans la littérature. Elles concerneraient particulièrement les canaux éjaculateurs situés au niveau prostatique.

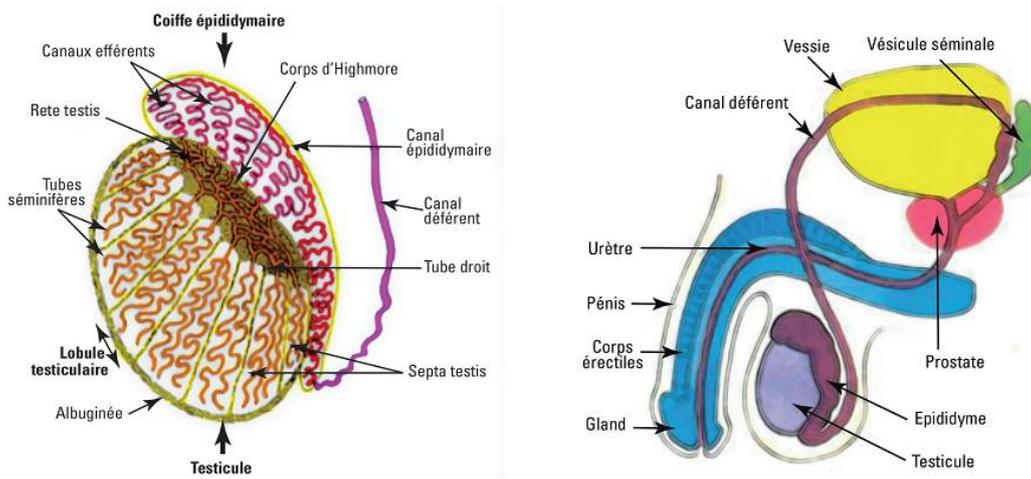


Figure 8: Vue anatomique schématique du trajet suivi par les spermatozoïdes depuis la libération dans la lumière des tubes séminifères jusqu'à l'expulsion lors de l'éjaculation. (Young et *al.*, 2016)

Tableau III: Infertilités masculines par anomalies « post-testiculaire » (Young et *al.*, 2016)

Génétiques

- Agénésie bilatérale des canaux déférents par mutation du gène *CFTR*, aussi responsable de la mucoviscidose (sans malformation rénale)
- Agénésie des déférents avec agénésie rénale unilatérale
- Syndrome de Young (sinusites, infections pulmonaires, et azoospermie, *CFTR* normal)

Acquises

- Compression du rete-testis
 - inclusions surrénaliennes intra-testiculaires (Bloc 21-hydroxylase)
 - infectieuses
- Obstruction idiopathique de l'épididyme
- Obstruction des canaux déférents
 - Post vasectomie volontaire
 - Cure chirurgicale d'hernie inguinale avec ligature des déférents
- Obstruction des canaux éjaculateurs (infectieuse)
- Anomalies fonctionnelles de l'éjaculation
 - Neuropathie diabétique
 - Traumatisme de la moelle épinière
 - Sclérose en plaques
 - Lésions neurologiques chirurgicales par curage ganglionnaire retro-péritonéal

I.3.4 Infertilités masculines idiopathiques

Elles seraient à l'origine de près de 50% des infertilités (Agarwal et *al.*, 2015 ; Krausz et *al.*, 2015). Il s'agit d'hommes ayant une fonction gonadotrope normale et chez qui l'exploration des voies excrétrices n'a pas permis de mettre en évidence d'obstacle. Chez ces patients le caryotype et les explorations génétiques de première ligne ne montrent pas d'anomalie. Les altérations de la spermatogenèse testiculaire sont fréquentes, ce qui suggère une maladie primitivement testiculaire (Young et *al.*, 2016).

I.4 Déterminants de l'infertilité masculine

I.4.1 Déterminants du style de vie

✓ La cigarette

La fumée de cigarette contient > 7000 produits chimiques, y compris les nitrosamines hautement cancérigènes spécifiques au tabac, [exemple : 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone et Nnitrosonornicotine], hydrocarbures aromatiques polycycliques (exemple : benzo [a] pyrène), et composés organiques volatils (exemple : benzène) (CDCP, 2010). Les fumeurs de cigarettes sont exposés à des substances dangereuses telles que le goudron, la nicotine (qui est très addictif), le monoxyde de carbone et les métaux lourds (par exemple, le cadmium et le plomb (Dai et *al.*, 2015). Le tabagisme est un facteur de risque potentiel connu pour une diminution de la fertilité masculine. Le tabagisme est associé à la leucocytospermie, une source endogène importante d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). En outre, la fumée de tabac contient ERO à des niveaux qui peuvent submerger les défenses antioxydantes endogènes. L'augmentation du niveau sérial des ERO chez les fumeurs expose les spermatozoïdes au stress oxydatif, compromettant ainsi la fonction des spermatozoïdes et compromettant finalement la fertilité masculine (cité dans (harlev et *al.*, 2015)). Cependant, les mécanismes qui sous-tendent les effets du tabagisme sur la qualité du sperme n'ont pas été entièrement clarifiés.

Une méta-analyse impliquant des hommes de 26 pays a conclu que le tabagisme provoque une baisse de la qualité du sperme chez les hommes fertiles et infertiles (Li et *al.*, 2011).

La concentration de spermatozoïdes chez les fumeurs masculins était généralement de 13 à 17% inférieure à celle des non-fumeurs (Vine et *al.*, 1994). De plus, le tabagisme a été associé négativement au nombre de spermatozoïdes, à la mobilité et à la morphologie. Le déclin de la qualité du sperme s'est révélé plus marqué chez les fumeurs lourds (> 20 cigarettes/jour) et modérés (10 – 20 cigarettes/jour) que chez les fumeurs légers (1 – 10 cigarettes/jour). L'effet

était plus élevé chez les hommes infertiles que dans la population générale (Sharma et *al.*, 2016). Outre son association avec la fertilité masculine altérée, le tabagisme est également responsable de l'augmentation des dommages à l'ADN, aneuploïdies, et des mutations dans le sperme (Beal et *al.*, 2017). Une étude a suggéré que la détérioration de la qualité du sperme chez les fumeurs masculins était corrélée avec une augmentation des taux de fragmentation de l'ADN et une diminution de l'expression du point de contrôle kinase 1 (CHK1). Sans l'activation de CHK1 en réponse à des dommages à l'ADN, il y aurait une baisse de la réparation du sperme conduisant à une augmentation de l'apoptose du sperme, qui pourrait abaisser la qualité du sperme (Cui et *al.*, 2016).

Ainsi, l'effet général du tabagisme sur la fertilité masculine peut résulter des rôles combinés de stress oxydatif élevé, de lésions de l'ADN et d'apoptose cellulaire, ce qui pourrait expliquer non seulement la réduction de la qualité du sperme, mais aussi une altération de la spermatogenèse, de la maturation sperme, et la fonction de sperme chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs. Les facteurs contribuant à ces effets chez les fumeurs masculins comprennent la présence de nicotine et de son métabolite, la cotinine, le benzo (a) pyrène, ainsi que les teneurs en cadmium (Dai et *al.*, 2015).

✓ **L'alcool**

Une méta-analyse impliquant 29 914 hommes a rapporté une association significative entre la consommation d'alcool et la baisse du volume de sperme, mais pas les paramètres du sperme (Li et *al.*, 2011). Cependant, une méta-analyse récente impliquant 16 395 hommes a rapporté que l'ingestion d'alcool a un effet néfaste sur le volume de sperme et la morphologie des spermatozoïdes (Ricci et *al.*, 2017). L'exposition directe des spermatozoïdes à l'alcool (à des concentrations correspondant à celles du sérum après une consommation modérée et lourde) a été jugée nocive pour la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes de façon dose-dépendante (Donnelly et *al.*, 1999).

Les actions de l'alcool sur le système reproducteur masculin semblent se produire à tous les niveaux de l'axe hypothalamus – hypophysaire – gonadique (HPG). L'alcool semble interférer avec la production de GnRH, FSH, LH, et la testostérone, ainsi que nuire aux fonctions des cellules de Leydig et Sertoli. En conséquence, la production, le développement morphologique et la maturation des spermatozoïdes pourraient être altérées (Emanuele et *al.*, 1998). La spermatogenèse semble diminuer graduellement avec l'augmentation de la consommation d'alcool (Pajarinen et *al.*, 1996). L'arrêt de la spermatogénèse partielle ou

complète et le syndrome des cellules de Sertoli étaient plus fréquents chez les buveurs lourds que chez les non-buveurs (Pajarinen et *al.*, 1994).

La consommation d'alcool chronique a eu un effet néfaste sur la qualité du sperme et sur les taux d'hormones de reproduction chez les hommes (Muthusami et *al.*, 2005). Inversement, une étude comprenant 8344 volontaires sains de sexe masculin a constaté que la consommation modérée d'alcool était associée à des niveaux plus élevés de testostérone mais pas avec la qualité de sperme (Jensen et *al.*, 2014). L'administration d'éthanol chronique a été reconnue pour diminuer les activités enzymatiques stéroïdogéniques et antioxydantes de testicule entraînant l'augmentation du stress oxydatif (Maneesh et *al.*, 2005), qui pourrait perturber la synthèse de testostérone et compromettre la fertilité.

Une étude sur les partenaires masculins des couples confrontés à l'infertilité primaire a révélé que la Tératozoospermie était présente chez 63% et 72% des hommes qui buvaient modérément (40 – 80 g/jour) et de façon importante (> 80 g/jour), respectivement. Aucun des buveurs d'alcool fort n'était normozoospermique et la plupart étaient oligozoospermiques (64%), ce qui suggère des lésions testiculaires progressives par rapport à l'augmentation de la consommation quotidienne d'alcool (Gaur et *al.*, 2010).

De même, une autre étude a révélé que les taux de consommation d'alcool étaient significativement plus élevés chez les hommes présentant une oligozoospermie sévère et avec une azoospermie non obstructive comparativement aux témoins fertiles (Zhang et *al.*, 2012).

Bien que les effets de l'alcool sur la fonction reproductive masculine dépendent de la quantité absorbée, une quantité seuil d'alcool au-delà de laquelle le risque d'augmentation de l'infertilité masculine n'a pas encore été déterminée. De plus, il faut garder à l'esprit que si l'ingestion d'alcool et le tabagisme seul n'affectaient pas les paramètres du sperme, les deux habitudes semblent avoir un effet additif susceptible de modifier négativement les paramètres du sperme (Martini et *al.*, 2004).

✓ **L'obésité**

Le surpoids et l'obésité sont associés à une accumulation excessive de graisse, qui peut être évaluée en utilisant l'indice de masse corporelle (IMC). Les hommes en surpoids (IMC 25 – 29,9 kg/m²) et obèses (IMC \geq 30 kg/m²) sont associés à une diminution de la qualité du sperme et à un risque accru d'infertilité (Campbell et *al.*, 2015). Un examen systématique de 30 études comprenant 115 158 hommes a révélé que l'obésité paternelle était associée à un

potentiel reproducteur masculin abaissé. Les hommes qui étaient obèses avaient un pourcentage plus élevé de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN, morphologie anormale et faible potentiel membranaire mitochondrial (MMP), et étaient plus susceptibles d'être infertiles (Campbell et *al.*, 2015). Les spermatozoïdes à forte fragmentation de l'ADN et à faible MMP sont associés à des niveaux élevés de ROS (Lobascio et *al.*, 2015).

Une méta-analyse impliquant 13 077 hommes a rapporté que les hommes obèses étaient plus susceptibles d'être oligozoospermiques ou azoospermiques comparativement aux hommes de poids normal (Sermondade et *al.*, 2013). Une étude plus restreinte comprenant 23,3% d'hommes obèses a montré que les hommes qui étaient en surpoids et obèses n'avaient aucun risque relatif accru de paramètres de sperme anormaux, bien que leurs taux de testostérone et de globuline liant les hormones sexuelles diminuaient avec l'IMC croissant (MacDonald et *al.*, 2013). En outre, les taux d'inhibine B sont diminués, tandis que les niveaux d'œstradiol sont augmentés chez les hommes en surpoids ou obèses (Chavarro et *al.*, 2010).

La présence d'excès de tissu adipeux blanc chez les personnes obèses provoque une augmentation de la conversion de la testostérone en œstrogènes, et affecte l'axe HPG conduisant à une réduction de la libération de gonadotrophine. Ces effets entraînent un hypogonadisme secondaire et une altération de la spermatogénèse (Palmer et *al.*, 2012). L'augmentation de la production de leptine par le tissu adipeux blanc diminue la production de testostérone.

Les adipokines stimulent la production des ERO par les leucocytes. La résistance à l'insuline et la dyslipidémie peuvent induire une inflammation systémique, entraînant un stress oxydatif (fernandez-sanchez et *al.*, 2011).

L'augmentation de l'adiposité scrotale conduit à une élévation de la température testiculaire et provoque un stress oxydatif. L'augmentation de la température scrotale ainsi que le manque d'activité altère la spermatogénèse. Les cibles des ERO sont principalement les acides gras polyinsaturés, en raison de la présence de nombreuses doubles liaisons (Halliwell et *al.*, 1989). Ainsi, l'augmentation du stress oxydatif compromet la mobilité du spermatozoïde, l'intégrité de l'ADN et l'interaction spermatozoïdes – ovocytes (Durairajanayagam et *al.*, 2015).

✓ Âge paternel avancé (APA)

L'âge maternel avancé est défini comme l'âge de 35 ans, au-delà duquel il y a des risques significativement plus importants d'effets néfastes sur la reproduction chez les femmes (Ramasamy et *al.*, 2015). Cependant, l'âge paternel avancé (APA) n'a pas été aussi bien défini, les études disent qu'il se situe entre 35 et 50 ans (Wu et *al.*, 2016). Une méta-analyse de 90 études impliquant 93 839 participants a rapporté une baisse associée à l'âge du volume de sperme, du total des spermatozoïdes et de la mobilité progressive, de la morphologie normale du sperme et d'une augmentation de la fragmentation de l'ADN. Cependant, malgré son déclin au fil du temps, la concentration de spermatozoïdes n'a pas diminué avec l'âge masculin croissant (Johnson et *al.*, 2015).

L'analyse des paramètres de sperme des hommes sains sur une large tranche d'âge (22 – 80 ans) a montré que le volume de sperme et la motilité du sperme diminuaient graduellement et continuellement avec l'âge sans seuil d'âge spécifique (Eskenazi et *al.*, 2003). Cependant, une étude rétrospective portant sur 5081 hommes (âgés de 16,5 à 72,3 ans) a suggéré que le déclin des paramètres du sperme et le seuil d'âge correspondant étaient les suivants:

- Le nombre total de spermatozoïdes et sperme mobiles total : après 34 ans;
- La concentration de spermatozoïdes et la fraction de sperme avec une morphologie normale : après 40 ans;
- La mobilité du sperme et les paramètres progressifs du sperme mobiles : après 43 ans;
- Le volume de l'éjaculat : après 45 ans;
- Le ratio de spermatozoïdes Y:X -déplacement des spermatozoïdes dans l'éjaculat : après 55 ans.

Ainsi, les auteurs ont proposé qu'indépendant de l'âge de la femme, la probabilité de la grossesse diminue après des rapports sexuels avec des hommes âgés de > 34 ans (Stone et *al.*, 2013). Les mécanismes exacts qui sous-tendent la diminution de la fertilité masculine associée à l'âge n'ont pas été déterminés (Belloc et *al.*, 2014).

Ces changements dépendants de l'âge de la qualité du sperme pourraient probablement être attribués à des changements physiologiques normaux dans le tractus reproducteur qui surviennent avec le vieillissement, une diminution de la capacité de réparation cellulaire et tissulaire des dommages induits par l'exposition à des substances toxiques ou des maladies, et

des chances accrues avec l'âge d'avoir des dommages à la reproduction résultant d'expositions exogènes telles que le tabagisme ou les infections (Eskenazi et *al.*, 2003). Le fait que les processus physiologiques normaux et les facteurs environnementaux pourraient être tenus responsables des effets du vieillissement sur le système reproducteur masculin ajoute à sa complexité (Gunes et *al.*, 2016).

Lorsque les hommes vieillissent, la fonction testiculaire et le métabolisme se détériorent. Ainsi, les testicules subissent des changements morphologiques liés à l'âge tels que la diminution du nombre de cellules germinales, des cellules de Leydig et de Sertoli, ainsi que des changements structurels, y compris le rétrécissement de tubules séminifères (Gunes et *al.*, 2016). Les concentrations de testostérone libre et totale diminuent régulièrement lorsque l'âge de l'homme augmente, conduisant à un hypogonadisme primaire. La régulation de l'axe HPG est également altérée à l'âge avancé des hommes. L'accumulation des ERO dans les cellules germinales mâles tout au long du vieillissement entraîne un stress oxydatif et des dommages à l'ADN du sperme.

L'apoptose est également augmentée dans les testicules des hommes âgés (Gunes et *al.*, 2016). Ces changements liés à l'âge entraînent inévitablement une détérioration de la qualité et de la quantité du sperme.

Indépendamment de l'âge maternel, l'APA est associée à des taux accrus d'avortement spontané et à des taux de grossesse inférieurs chez les couples tentant de concevoir soit naturellement soit en utilisant des techniques de procréation médicalement assistée (Belloc et *al.*, 2014). L'association entre l'APA et la perte fœtale suggère que les mutations d'ADN provenant de l'homme vieillissant sont préjudiciables à la santé de la progéniture (Ramasamy et *al.*, 2015). Le vieillissement paternel provoque des changements génétiques et épigénétiques dans les spermatozoïdes, qui pourraient passer par la fertilisation dans la progéniture, causant une variété de maladies dans la progéniture résultante (Gunes et *al.*, 2016).

✓ **L'alimentation**

L'alimentation et la nutrition jouent un rôle important dans la qualité du sperme. Un récent examen systématique exhaustif des études observationnelles a conclu que l'ingestion d'une alimentation saine et équilibrée pourrait améliorer la qualité du sperme et les taux de fécondité chez les hommes (Salas-Huetos et *al.*, 2017). Par exemple, le régime méditerranéen, enrichi en acides gras oméga-3, en antioxydants et en vitamines, et faible en acides gras

saturés et trans, s'est révélé inversement associé à des paramètres de qualité du sperme faibles (Salas-Huetos et *al.*, 2017). Ainsi, une plus grande conformité au régime méditerranéen peut aider à améliorer la qualité du sperme (Karayiannis et *al.*, 2017).

Une autre étude a défini un régime typique de style occidental comme celui composé de beaucoup de viande rouge et transformée, des grains raffinés et des boissons à haute énergie, tandis qu'un régime plus « prudent » est composé principalement de viande blanche, de fruits, de légumes et de grains entiers. Le régime sain « prudent » a été positivement associé à la mobilité progressive du sperme, mais pas à la concentration et à la morphologie du sperme (Gaskins et *al.*, 2012). En fait, un apport alimentaire sain a été rapporté pour améliorer au minimum une mesure de la qualité du sperme (Giahi et *al.*, 2016). Pour commencer, la pratique consistant à remplacer les viandes rouges transformées par des poissons peut avoir un impact positif sur la numération et la morphologie des spermatozoïdes (Afeiche et *al.*, 2014). Les légumes et les fruits, le poisson et la volaille, les céréales et les produits laitiers à faible teneur en gras étaient parmi les aliments positivement associés à la qualité du sperme. Toutefois, les régimes constitués de viandes transformées, de produits laitiers riches en graisses, d'alcool, de café et de boissons sucrées ont été associés à une mauvaise qualité du sperme et à des taux de fécondité inférieurs (Salas-Huetos et *al.*, 2017).

La plupart des études n'ont pas trouvé d'association entre la consommation modérée de caféine et la fertilité masculine. Une grande méta-analyse avec 29 914 participants n'a révélé aucun effet significatif de la consommation de café sur la qualité du sperme (Li et *al.*, 2011). Une autre étude portant sur 2554 jeunes hommes danois n'a également trouvé aucune association entre la caféine modérée (≤ 800 mg/jour) ou la consommation de Cola (≤ 1 L/jour) et la réduction de la qualité du sperme (Jensen et *al.*, 2010).

Cependant, Belloc et *al.* (2013) ont constaté que près de 76% des consommateurs de caféine ($3,0 \pm 1,8$ tasses de café/jour) avaient une légère augmentation du volume de sperme, alors que les patients souffrant de vasectomie fertile qui buvaient ≥ 6 tasses de café/jour présentaient une plus grande mobilité des spermatozoïdes (Sobreiro et *al.*, 2005). Un récent examen systématique impliquant 19 967 hommes a révélé que, dans la plupart des études, les paramètres du sperme étaient affectés par des boissons contenant du Cola et des boissons gazeuses contenant de la caféine, mais pas par l'apport de caféine provenant principalement de boissons au café, au thé et au cacao (Ricci et *al.*, 2017).

La consommation de caféine peut altérer la fonction reproductive masculine possiblement par des lésions de l'ADN du sperme. La méta-analyse de Ricci et *al.* (2017) suggère que la consommation de caféine pourrait être associée à des ruptures d'ADN à double brin et à l'aneuploïdie du sperme, mais pas à des adduits d'ADN. Indépendant de l'âge, les hommes sains non-fumeurs dont la consommation quotidienne de café s'élevait à > 308 mg (~ 2,9 tasses) ont montré une augmentation des lésions de l'ADN du sperme à double brin (Schmid et *al.*, 2007). En revanche, l'étude Belloc et *al.* (2013) a révélé que la consommation de caféine était associée à un risque plus faible de fragmentation de l'ADN élevé (ratio de cotes 0,92, 95% IC 0,92 – 0,99).

✓ **Autres facteurs de risque liés au mode de vie**

Le stress de la chaleur génitale résultant de l'hyperthermie scrotale est un facteur de risque substantiel pour l'infertilité masculine. Des heures prolongées de séance ou d'exposition à la chaleur rayonnante, la varicocèle, le port de vêtements serrés et le cryptorchidisme peuvent tous conduire à un stress de la chaleur testiculaire (Durairajanayagam et *al.*, 2014). Des températures élevées du scrotum conduisent à l'arrêt de la spermatogénèse, à l'apoptose des cellules germinales, au stress oxydatif et aux lésions de l'ADN du sperme (Durairajanayagam et *al.*, 2015). Le cyclisme comme sport est associé à une augmentation de la production de chaleur testiculaire. Une formation intensive en cyclisme pendant 16 semaines chez les jeunes cyclistes routiers masculins sains a entraîné une augmentation des niveaux des ERO et de malondialdéhyde séminaux, ainsi qu'une diminution des antioxydants enzymatiques et de la capacité antioxydante totale. Ces changements ont été maintenus même après 4 semaines de rétablissement (Maleki et *al.*, 2014). En outre, les niveaux séminaux d'interleukines sont restés élevés chez ces cyclistes non professionnels et les paramètres du sperme ont été supprimés malgré les 4 semaines de rétablissement (Maleki et *al.*, 2015).

Les troubles du sommeil peuvent avoir des effets néfastes sur la fertilité masculine, car le volume de sperme était plus faible chez les patients ayant des difficultés à initier le sommeil, y compris ceux qui fument ou qui sont en surpoids (Vigano et *al.*, 2017). On a constaté que la perte de sommeil affectait la fonction du sperme dans une étude sur les animaux (Alvarenga et *al.*, 2015). L'utilisation constante d'appareils électroniques contribue également à une mauvaise hygiène du sommeil. L'exposition aux ondes électromagnétiques radiofréquence émises par l'utilisation de téléphones mobiles pourrait potentiellement exercer des effets nocifs sur le testicule (Agarwal et *al.*, 2015).

Une analyse a révélé que l'exposition au téléphone mobile est associée à une diminution de la mobilité et de la viabilité du sperme (Adams et *al.*, 2014), tandis qu'une autre étude a révélé que cet effet indésirable sur la mobilité et la viabilité du sperme n'a lieu que *in vitro* (Liu et coll., 2014).

I.4.2 Effets environnementaux (David Rizk et *al.*, 2013)

L'évaluation des résultats des effets de l'environnement sur la spermatogenèse dans les études du sperme humain est entravée par des incohérences dans les méthodes d'analyse biologique, dans les facteurs de contrôle et la conception de l'étude. Le mode de vie occidental et les conditions environnementales mondiales ont radicalement changé surtout en ce qui concerne l'alimentation et l'exercice. Ce changement radical suggère que ces facteurs peuvent être impliqués dans l'étiologie de la baisse de la fertilité masculine et de l'altération de la production de spermatozoïdes. Il est possible que ce changement ait provoqué ce déclin de la fertilité en raison de sa nature rapide et généralisée. Plusieurs des facteurs de vie et de travail discutés ci-dessous sont considérés comme des sujets de préoccupation majeurs.

✓ Engrais, pesticides et herbicides

Alors que les engrais et les pesticides ont révolutionné la production alimentaire, ces derniers ont également introduit de nouveaux produits chimiques et des toxines à des millions d'individus. Les engrais chimiques tels que l'azote et l'ammoniac sont largement utilisés dans l'agriculture aujourd'hui. Wu et *al.* en 2004 ont montré que l'oxyde nitrique réduit la mobilité du spermatozoïde, la viabilité, et d'autres paramètres de sperme; Il a également montré qu'il peut dans certains cas nuire à la capacité des spermatozoïdes à pénétrer dans l'ovocyte (Wu et *al.*, 2004). Jurewicz a suggéré qu'il existe des indications cohérentes que les pesticides comme le dichlorodiphényltrichloroéthane, mieux connu sous le nom de DDT, affectent le dénombrement des spermatozoïdes chez l'homme (Jurewicz et *al.*, 2009). En outre, des herbicides tels que le lindane, le méthoxychlore et la dioxine-TCDD ont tous été liés au stress oxydatif testiculaire et à une diminution du nombre de spermatozoïdes (Chitra et *al.*, 2001 ; Latchoumycandane et *al.*, 2002). Les conservateurs alimentaires utilisés dans les *fast-foods* sont également un moyen de pénétration des toxines dans la circulation sanguine, causant des problèmes de fertilité. Le Carbendazim est un fongicide systémique à large spectre couramment utilisé sur les fruits et le cuir (Selmanoglu et *al.*, 2001) ; Carter et *al.* (1987) ont constaté ses effets néfastes sur la reproduction masculine, y compris la diminution du poids testiculaire moyen et la réduction des diamètres des tubules séminifères (Carter et *al.*, 1987).

✓ **Produits chimiques, toxines et endocriniens**

○ **Les composés actifs**

Les produits chimiques et les toxines de l'environnement peuvent nuire à la fertilité (David Rizk et *al.*, 2013). Certains de ces produits chimiques ont des propriétés oestrogéniques et sont donc considérés comme toxiques parce qu'ils affectent l'état de fonctionnement normal du système endocrinien. De tels composés peuvent affecter les cellules de Leydig stimulées par la LH qui influencent la sécrétion d'androgène et interfèrent ainsi avec la régulation endocrinienne appropriée de la spermatogenèse. Le ratio idéal de testostérone et d'oestrogène peut être déplacé à la suite de tels perturbateurs endocriniens; Cela peut conduire à des erreurs dans la rétroaction et la régulation de l'axe hypothalamus-hypophysaire-gonadique (David Rizk et *al.*, 2013). En outre, les pro-oxydants et les antioxydants des cellules peuvent également être en déséquilibre. Une telle perturbation pourrait conduire à la génération de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces radicaux libres pourraient déstabiliser l'équilibre électrolytique dans les cellules. Les spermatozoïdes sont particulièrement sensibles aux ERO et à la peroxydation lipidique en raison de la grande quantité d'acides gras polyinsaturés présents dans leurs membranes (Rao et *al.*, 2015). Par conséquent, les toxines chimiques qui génèrent des ERO dans les spermatozoïdes sont assez significatives.

○ **Les produits chimiques dans le plastique.**

La quantité croissante de plastique dans les produits contemporains est une préoccupation en raison de la toxicité des produits chimiques infusé pour donner aux produits certaines qualités désirables. Les plastifiants sont des additifs chimiques polyphénoliques utilisés pour améliorer la souplesse et la ténacité du plastique et se retrouvent dans tous les plastiques clairs, résistants à la chaleur et incassables. Ces composés ont été déclarés toxiques pour le système reproducteur masculin. Un autre produit chimique similaire commun est le bisphénol A (BPA); Il est utilisé pour améliorer les plastiques de polycarbonate et se trouve dans les articles en plastique jetables, en particulier dans les couvercles des récipients alimentaires. Le BPA de ces récipients peut migrer dans les aliments et être distribué dans le corps (Korasli et *al.*, 2007 ; Le et *al.*, 2008). Il a été estimé qu'environ 90% des américains ont le BPA présent dans leur sang. Comme il s'agit d'un produit chimique répandu qui est connu pour réduire le nombre de spermatozoïdes, la motilité, et la viabilité, il est une menace environnementale importante pour la fertilité masculine. Chitra *al.* a rapporté que le BPA génère des ROS dans divers tissus de rat, y compris les organes reproducteurs (Chitra et *al.*, 2003). Chitra et *al.* a

également montré que le BPA augmente les niveaux de peroxyde d'hydrogène dans le tissu testiculaire. Ceci conduit par la suite à l'épuisement du système de défense antioxydant. Kabuto et *al.* (2004) a constaté que le BPA causait une surproduction de peroxyde d'hydrogène dans les reins, le foie et les testicules des rats (Kabuto et *al.*, 2004). Certains produits en plastique communs, y compris les sacs en plastique, jouets gonflables récréatifs, sacs de stockage de sang, vêtements en plastique, savons, et shampooings ont des esters de phtalate en eux pour améliorer la souplesse du plastique. Des études animales ont conclu qu'un ester de phtalate répandu couramment utilisé comme phtalate de di (2-éthylhexyle) a provoqué une atrophie testiculaire chez les animaux (Ishihara et *al.*, 2003 ; Peakall et *al.*, 1975; Gesler et *al.*, 1973). Une autre substance chimique communément trouvée qui a été examinée est le nonylphénol. Le nonylphénol est un additif plastique synthétique qui a des propriétés oestrogéniques et peut s'accumuler dans les tissus en raison de sa nature lipophile. On le trouve souvent dans les détergents, les peintures, les produits de soins personnels, la transformation des aliments et l'industrie de l'emballage.

- **Toxicité pour les métaux lourds**

Plusieurs études ont rapporté que la toxicité des métaux lourds chez les hommes a altéré la spermatogenèse et diminué le nombre de spermatozoïdes (Naha et *al.*, 2006; Acharya et *al.*, 2003; Xu et *al.*, 2003; Hsu et *al.*, 2002).

Le plomb inorganique peut perturber l'équilibre pro-oxydant et anti-oxydant et provoquer un stress oxydatif (Hsu et *al.*, 2002). Avant d'être banni, le plomb a été retrouvé dans une variété de produits communs, le plus connu étant la peinture au plomb; On a aussi constaté que le mercure s'accumule dans les poissons, ce qui fournit des moyens de surexposition. Comme le plomb, le cadmium a été fortement lié à l'infertilité; des teneurs en cadmium beaucoup plus élevées ont été trouvées dans le plasma séminal et dans le sang des hommes infertiles comparés à ceux des hommes fertiles (Benoff et *al.*, 2008). Une forte corrélation négative existe entre les concentrations de cadmium et de spermatozoïdes en raison de ses effets antistéroïdogéniques qui réduisent la production de testostérone (Benoff et *al.*, 2008). Les ouvriers en métal et les autres hommes qui sont exposés à ces métaux par leur profession peuvent être rendus moins fertiles en raison des effets toxiques de ces métaux.

I.5 Infertilité masculine et les infections

I.5.1 Les infections des glandes accessoires mâles (IGAM)

Les infections des glandes accessoires mâles (IGAM) comprennent la prostatite, l'urétrite, l'épididymite et l'orchite. Ces infections sont des causes potentiellement curables de l'infertilité masculine, bien que les études jusqu'ici n'aient pas été concluantes en montrant un effet sur la qualité de sperme et la fertilité masculine. Comhaire et *al.* (Brookings et *al.*, 2013) ont effectué une étude prospective en double aveugle portant sur l'effet de la doxycycline chez les couples infertiles atteints d'IGAM. Seulement 1,6% de couples infertiles évalués ont eu une qualité anormale de sperme avec la présence d'IGAM comme seule cause démontrable. La mobilité et la morphologie de sperme s'améliorait au fil du temps, mais cette amélioration ne semblait pas augmenter la probabilité de conception (Brookings et *al.*, 2013).

✓ La prostatite

La prostatite est souvent répertoriée comme une cause d'infertilité masculine, mais les preuves pour cela ne sont pas concluantes. Néanmoins, il est logique de considérer que n'importe quel processus de maladie qui affecte la fonction de prostate peut affecter le spermatozoïde et la fertilité (Brookings et *al.*, 2013).

La prostatite a récemment été classée en quatre conditions distinctes par le *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK)* en Prostatite bactérienne aigue, prostatite bactérienne chronique, prostatite chronique/douleur pelvienne chronique (cela peut être inflammatoire ou non) et, enfin, prostatite inflammatoire asymptomatique, qui est souvent constatée par hasard lors d'autres conditions urologiques ou des problèmes de fertilité. Une étude de Christiansen et *al.* publiée en 1991 a comparé des patients avec un diagnostic de prostatite-vesiculite abactérienne chronique (classification actuelle de NIDDK de prostatite chronique/douleur pelvienne chronique) avec des contrôles asymptomatiques. L'étude a montré que les patients de ce groupe avaient une augmentation de la détérioration de la qualité de sperme et de l'azoospermie, bien que certains aient été normospermiques. Les patients ayant une prostatite n'avaient pas tous une leucocytospermie et le degré de leucocytospermie n'était pas proportionnel à l'ampleur de la perturbation de la qualité de sperme. Giamarellou et *al.* (2010) ont étudié 30 hommes avec une prostatite chronique et une leucocytose ; après un traitement antimicrobiens prolongé, il y avait une amélioration ou une normalisation du nombre de spermatozoïdes chez 70% de ces hommes. La prostatite chronique est associée à plusieurs agents pathogènes, et il est possible que certains agents pathogènes puissent avoir un

plus grand effet sur la fertilité que d'autres. L'étude de Mazzoli et *al.* (2010) a comparé l'effet de la prostatite chronique due à la chlamydia trachomatis et la prostatite chronique due à d'autres uropathogènes. Dans cette étude, la prostatite chronique liée à la chlamydia a causé une concentration inférieure de sperme, une faible mobilité et une morphologie affectée plus que l'effet de la prostatite due à d'autres uropathogènes.

✓ L'urétrite

L'urétrite est le plus souvent causée par des infections par *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Ureaplasma urealyticum* ou *Mycoplasma genitalium*. D'autres causes moins courantes sont *Trichomonas vaginalis* (TV), le virus de l'herpès simplex (HSV), les réactions allergiques et les traumatismes (Brookings et *al.*, 2013). Il y a eu plusieurs études montrant l'effet sur la qualité et la fertilité de sperme de ces agents pathogènes bactériens. Rybar et *al.* (2012) a démontré que les contaminations par le sperme avec *Mycoplasma spp.* et chlamydia ont été associées à une diminution des concentrations de spermatozoïdes, le mycoplasme ayant le plus grand effet négatif sur la qualité des spermatozoïdes (concentration, mobilité, morphologie et condensation de l'ADN). Cependant, en dépit du traitement antibiotique réussi, les paramètres de qualité de sperme ne se sont pas améliorés à 3 mois après traitement (Rybar et *al.*, 2012).

L'évaluation de l'intégrité de la chromatine du spermatozoïde lors de la présence des ruptures d'ADN ne montrait aucune évidence que ceci ait été associé aux sous espèces de *Mycoplasma* ou à la chlamydia. Une étude menée au Royaume-Uni (Royaume-Uni) a récemment révélé qu'il y avait plus d'anomalies des paramètres du sperme chez les participants des cliniques génito-urinaires, en particulier chez les patients atteints d'urétrite asymptomatique et non spécifique, de chlamydia négative comparé aux hommes qui voyaient un spécialiste pour l'évaluation de leur fertilité (Carne et *al.*, 2012). Contrairement à cela, Gunyeli et *al.* (2011) n'ont trouvé aucune différence dans la prévalence des agents pathogènes associés à l'urétrite, en comparant les couples fertiles et infertiles. Il est possible que la coexistence d'autres facteurs simultanément présents avec une infection puisse conduire à une fertilité altérée.

Chlamydia trachomatis est l'une des infections sexuellement transmissibles (IST) les plus courantes dans le monde et l'IST bactérienne la plus fréquemment signalée en Angleterre et aux États-Unis. La majorité des cas chez les hommes sont asymptomatiques.

Plusieurs études au fil des ans ont montré que la détection de la chlamydia dans le sperme ou l'urine a été associée à une réduction de certains paramètres de la fonction et du nombre des

spermatozoïdes. Rybar et *al.* (2012) ont montré une réduction du nombre de spermatozoïdes. Les études de Cengiz et *al.* (Brookings et *al.*, 2013), Gallegos et *al.* (2008), Gdoura et *al.* (Brookings et *al.*, 2013), et Kokab et *al.* (2010) confirment tous que la présence de Chlamydia est en effet associée à une réduction du pourcentage de spermatozoïdes progressivement mobiles et Cengiz et *al.* (Brookings et *al.*, 2013) ont observé une viabilité réduite.

Gallegos et *al.* (2008), ont rapporté la fragmentation de l'ADN du spermatozoïde qui s'est améliorée quand l'infection de Chlamydia a été traitée, ceci est contradictoire aux résultats de Gdoura et *al.* (Brookings et *al.*, 2013), qui n'ont trouvé aucune évidence de fragmentation d'ADN. En dépit d'un pourcentage réduit de spermatozoïdes progressivement mobiles Kokab et *al.* (2010) n'a trouvé aucune preuve d'un effet sur le pourcentage de spermatozoïdes immobiles ou viables. Vigil et *al.* (Brookings et *al.*, 2013), n'a montré aucun effet significatif sur la concentration de spermatozoïdes, la mobilité et/ou la morphologie. Des résultats contradictoires se sont également produits dans des études examinant l'effet de la présence des anticorps de *C. trachomatis* sur la fertilité, avec Joki-Korpela et *al.* (2009) suggérant une association, tandis qu'Ochsendorf et *al.* (Brookings et *al.*, 2013) ont constaté que, en dépit d'une réponse inflammatoire, il n'y avait aucun effet sur des paramètres de sperme. Il a été démontré que la présence de corps élémentaires de *C. trachomatis* serovar E a causé une diminution significative de spermatozoïde mobile avec une augmentation des spermatozoïdes morts (Brookings et *al.*, 2013), ce qui suggère un effet direct de la chlamydia sur le spermatozoïde.

La gonorrhée est causée par *N. gonorrhoeae*, un diplococcus Gram négatif. On estime à 62 millions le nombre de personnes infectées chaque année dans le monde (WHO, 2013). C'est la deuxième IST la plus courante au Royaume-Uni et une cause commune de l'urétrite. En Angleterre, il y a eu 20 965 cas en 2011, une augmentation de 25 % par rapport à 2010 (HPA, 2012). Dans 10 % des cas de gonorrhée, il y a une infection chlamydiale concomitante. Si elle n'est pas traitée rapidement ou adéquatement, la cicatrisation et l'oblitération subséquentes du canal épидidymal suivant une infection aiguë sont habituellement persistantes même après traitement. Si bilatérale, l'infection aura comme conséquence l'azoospermie obstructive (Brookings et *al.*, 2013). Avec l'augmentation de la résistance aux médicaments de plus en plus la gonorrhée, cette complication peut devenir plus répandue à l'avenir.

✓ L'épididymite

L'épididymite aiguë est le plus souvent causée par une infection bactérienne. Une IST comme la chlamydia ou la gonorrhée est la cause la plus fréquente chez les hommes de moins de 35 ans. (Brookings et *al.*, 2013) Chez les hommes plus âgés, en particulier ceux qui ont des antécédents d'obstruction de sortie de la vessie, *Escherichia coli* est plus fréquent. Les causes plus rares de l'épididymite incluent *Mycobacterium tuberculosis*. Les causes non infectieuses incluent la maladie de Bechet, la manipulation urétrale, la post vasectomie, et les effets indésirables de l'amiodarone. L'épididymite syphilitique a également été décrite et classée en trois formes : interstitiel diffus aigu, interstitiel diffus chronique, et gummateuse (Brookings et *al.*, 2013).

Avec n'importe quel processus inflammatoire chronique, il y a un risque de fibrose et de cicatrice avec le potentiel de causer l'obstruction de l'épididyme. Bien que rare, l'occlusion bilatérale des épидидymes cause de l'azoospermie et, par conséquent, l'infertilité masculine.

L'orchite peut être causée par une variété d'infections virales ou bactériennes. La cause la plus connue est les oreillons, qui sont généralement associés à l'orchite unilatérale ou bilatérale si elle se produit après la puberté. Cela peut entraîner une baisse de la fertilité. Bien que rare, les complications de l'orchite incluent l'atrophie testiculaire ou l'infarctus et peuvent affecter la fertilité (Brookings et *al.*, 2013).

I.5.2 IST Virale

Il a été démontré que le VIH a un impact sur la fertilité masculine. Shevchuk et *al.* (Brookings et *al.*, 2013) ont montré qu'avec la prolongation de la survie chez les patients atteints du sida, il y avait une perte plus prononcée de cellules germinales dans les testicules. Plusieurs études ont montré des paramètres anormaux de sperme, alors que d'autres, telles que Crum-Cianflone et autres (Crum-Cianflone et *al.*, 2007), suggèrent que le VIH est une cause connue de l'hypogonadisme secondaire et donc un faible niveau de testostérone. Une faible testostérone est associée à une diminution du nombre de spermatozoïdes. Crittenden et *al.* (Brookings et *al.*, 2013) ont montré que les hommes séropositifs ont plus de sperme visqueux contenant moins de spermatozoïdes mobiles et plus de cellules rondes. Nicopoullos et *al.* (2004) ont également décrit une altération significative des paramètres du sperme chez les hommes séropositifs, avec une réduction du volume de l'éjaculat, de la concentration de spermatozoïdes, de la motilité progressive et du nombre total. Une diminution de la morphologie normale des spermatozoïdes a également été observée. Il y avait une corrélation

positive observée entre le compte de CD4 et la concentration de sperme, le nombre total, la motilité, le type progressif de motilité et la concentration de post-préparation, et également une corrélation négative significative avec la morphologie normale de sperme. Nicopoulos et *al.* (2004) ont ensuite montré que la prise de la multithérapie avec une charge virale du VIH de 1 000 copies/mL est associée à une amélioration significative des résultats de l'insémination intra-utérine (IUI). Le statut et la conception séropositifs sont un problème difficile lorsqu'il s'agit de couples sérodiscordants. Si ce n'est que la femme qui est séropositive, c'est facilement surmonté par l'utilisation de l'auto-insémination. L'infection à VIH non traitée est associée à un risque accru d'avortement spontané, de mortinaissance prématurité. Le dépistage prénatal et l'utilisation de la multithérapie ont permis de réduire ces risques, mais malgré le traitement, les femmes séropositives sont encore moins susceptibles de concevoir que les femmes séronégatives. Si l'homme est séropositif dans le couple sérodiscordant, le lavage des spermatozoïdes est le moyen idéal de concevoir.

I.5.3 *Trichomonas vaginalis*

Les chiffres de l'OMS estiment à 173,46 millions le nombre de cas d'infection à *Trichomonas vaginalis* en 1999, et la considère comme l'IST la plus courante dans le monde. La prévalence estimée aux États-Unis est de 3,1 % (Sutton et *al.*, 2007). L'infection a tendance à être asymptomatique, ne causant des symptômes que dans environ 30% des cas. L'association de la Trichomonose et de l'infertilité est controversée. Tuttle et *al.* (Brookings et *al.*, 2013) ont démontré que le mélange in vitro de sperme avec des trichomonas a réduit l'activité de spermatozoïde. Gopalkrishnan et *al.* (Brookings et *al.*, 2013) ont montré que la présence de trichomonas était associée à une réduction de la mobilité et de la viabilité des spermatozoïdes par une réduction du pourcentage de morphologie normale. Le traitement a sensiblement amélioré ces paramètres chez 50% d'hommes après une dose de metronidazole. Inversement, une étude de Daly et *al.* (Brookings et *al.*, 2013) n'a montré aucun effet sur le nombre ou la mobilité des spermatozoïdes en présence de trichomonas in vitro. Bien que peu concluants, les preuves suggèrent que s'il y a un effet sur le sperme dû à la présence des trichomonas, il devrait en théorie être réversible.

I.5.4 Syphilis

Bien qu'un effet toxique direct de la syphilis sur la fertilité masculine n'ait pas été rapporté dans la littérature, les complications de la syphilis peuvent affecter la fertilité. L'épididymite syphilitique a le potentiel de causer l'obstruction de l'épididyme. L'endarterite oblitérante chronique et l'inflammation interstitielle peuvent se produire dans la syphilis congénitale ou tertiaire et mener aux petits testicules fibrotiques (Brookings et *al.*, 2013). Les lésions gummateuses causent la destruction du tissu local et, si se produisant dans les testicules, peuvent avoir un impact sur la fonction testiculaire et la fertilité. Il peut également y avoir un effet indirect: tabes dorsalis, une forme de neuro-syphilis, peut causer la dysfonction érectile.

I.6 Diagnostic de l'infertilité masculine : exploration initiale

I.6.1 Interrogatoire (Young et *al.*, 2016)

Il vise à recueillir des données sur le passé familial ou personnel ayant un lien de causes évidentes d'infertilité. Au niveau familial, il peut s'agir d'autres cas chez des apparentés. Au niveau personnel, l'ensemble des antécédents pathologiques pouvant prédisposer à une altération de la fertilité seront notés (traitement de cancers, chirurgie de la sphère génitale). On recherchera une éventuelle consanguinité. La sexualité du couple sera aussi évaluée systématiquement pour écarter des dysfonctionnements évidents. Chez l'homme, on dépistera un trouble de l'érection ou l'absence d'éjaculation. L'interrogatoire cherchera toute prise médicamenteuse pouvant perturber la fertilité en particulier des traitements inopinés par des androgènes ou des anabolisants.

I.6.2 Examen clinique (Young et *al.*, 2016)

Il vise tout d'abord à vérifier le bon développement pubertaire et à écarter toute maladie, anomalie ou malformation générale. On cherchera des signes cliniques d'hypogonadisme comme une gynécomastie, un aspect gynoïde ou une diminution de la pilosité et des masses musculaires. Un examen orienté et soigneux de la verge, de la région pelvienne et inguinale et du contenu intra scrotal sera réalisé. Il vise essentiellement à évaluer le volume testiculaire qui est un élément clé du diagnostic et peut aussi avoir un impact pronostique. Cette évaluation est facilitée par l'utilisation d'un orchidomètre de Prader (Figure 9) qui note la consistance des testicules. Les testicules doivent être fermes et une diminution de la fermeté témoigne souvent d'une maladie testiculaire. La taille et la morphologie de la verge sont précisées pour écarter toute anomalie, tel qu'un micro pénis ou un hypospadias. On cherche systématiquement des cicatrices au niveau des organes génitaux et des orifices inguinaux

(intervention pour cryptorchidie ou cure chirurgicale d'hernie). Lorsqu'on a l'habitude de l'examen clinique de la sphère génitale masculine on cherche une varicocèle important, on vérifie la présence et l'intégrité des canaux déférents et l'intégrité du corps de l'épididyme. Les médecins moins expérimentés dans ce domaine peuvent vérifier l'intégrité de ces structures grâce à l'échographie du scrotum et des organes génitaux internes, à condition que cet examen morphologique soit réalisé par des radiologues ou urologues experts.

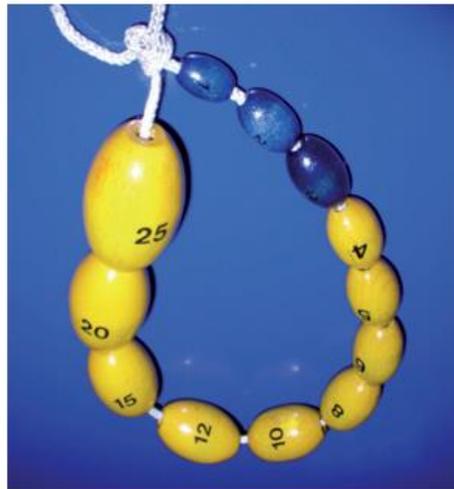


Figure 9: Orchidectomètre de Prader (permet d'évaluer le volume testiculaire). (Young et *al.*, 2016)

L'exploration de la fertilité chez l'homme est basée d'abord sur la réalisation d'un spermogramme après 2 à 3 jours d'abstinence (WHO, 2010).

I.6.3 Le spermogramme

Il est l'examen clé d'un homme suspecté d'infertilité et doit être obligatoire demandé lors d'une infertilité du couple, qu'elle soit supposée d'origine féminine ou masculine (AUA, 2011). Il est important d'expliquer au patient que cet examen nécessite de réaliser une masturbation au laboratoire après une abstinence sexuelle de 3 jours. Il est de même recommandé de ne pas faire cet examen pendant ou dans les 3 mois qui suivent une affection intercurrente qui pourrait altérer la qualité spermatique de façon non spécifique et réversible. Les principaux paramètres mesurés, avec leurs valeurs normales de référence établies par l'OMS (WHO, 2010), sont indiqués dans le Tableau IV ainsi que les principales anomalies observées.

L'analyse morphologique des spermatozoïdes permet d'évaluer le pourcentage respectif de formes normales et anormales. Si ces dernières sont très augmentées on parle de

tératospermie. A partir de cette analyse est établi un premier « phénotype spermatique », essentiel pour préciser le pronostic. Les anomalies observées au spermogramme doivent être considérées comme un symptôme dont les causes peuvent être multiples, les thérapeutiques diverses et les pronostics variables. Ainsi, par exemple, devant une azoospermie le pronostic peut être excellent si la cause est un hypogonadisme hypogonadotrope, très bon en cas d'obstacle au niveau des déférents mais mauvais en cas de microdélétion de AZFa (Krausz et al., 2014; Sadeghi-Nejad et al., 2008; Pryor et al., 1997).

Avant de conclure à une réelle azoospermie, le sperme doit subir une ultracentrifugation de façon à déceler d'éventuels spermatozoïdes non visualisés lors du comptage standard (cryptozoospermie) (AUA, 2011 ; WHO, 2010). La découverte d'éventuels spermatozoïdes dans le culot de centrifugation peut avoir une importance cruciale au plan thérapeutique. Le volume de l'éjaculat a une valeur d'orientation lorsqu'il est réduit. Il suggère la présence d'un obstacle, une hypoplasie des vésicules séminales ou plus rarement un hypogonadisme ou une insensibilité aux androgènes (Massin et al., 2012). En cas d'azoospermie chez un homme atteint de diabète ancien, surtout s'il y a d'autres atteintes neurovégétatives, on cherchera une éjaculation rétrograde par anomalie du sphincter de l'urètre vésical. La présence de spermatozoïdes dans les urines après un rapport sexuel ou une masturbation est très évocatrice de ce diagnostic (Gaunay et al., 2013).

Chez un nombre important d'hommes consultant pour infertilité, on détecte des atteintes à la fois quantitatives (oligospermie) et qualitatives avec des anomalies de la mobilité (asthénospermie) et des formes anormales (tératospermie), on parle alors d'oligo-asthénotératospermie, désignée souvent par le sigle « OAT ». Là encore, il s'agit d'un profil spermatique dont les causes peuvent être diverses, aussi bien acquises suite à un déficit gonadotrope ou une agression physique, chimique ou infectieuse du testicule que secondaires à des anomalies chromosomiques ou génétiques (Young et al., 2016). Une OAT n'est pas, en soi, un diagnostic mais simplement un symptôme qui nécessite une enquête étiologique. La présence de leucocytes dans le liquide séminal est physiologique, mais leur nombre ne doit pas dépasser 1×10^6 (Young et al., 2016).

Un nombre anormalement élevé doit faire évoquer une infection à bas bruit, d'autant plus que le volume de l'éjaculat est réduit, et faire pratiquer une spermoculture, de façon à tenter d'identifier le germe et à proposer un traitement antibiotique adapté (AUA, 2011 ; WHO, 2010). Dans ce contexte une échographie scrotale et des organes génitaux internes (OGI) est

souvent utile pour détecter des lésions séquellaires sur l'appareil excréteur et les glandes annexes (prostate et vésicules séminales).

De plus, la diffusion de l'échographie des OGI, pouvant être réalisée en même temps que l'échographie scrotale, et dont les performances techniques se sont améliorées de façon très significative parallèlement à l'accumulation d'expertise par les radiologues spécialisés (Lotti et al., 2015) ont contribué à l'obsolescence de cet examen complémentaire ancien.

Tableau IV: Valeurs normales du spermogramme. (WHO, 2010)

Paramètre	Valeurs normales	Définition de l'anomalie
Volume	1,5 à 6 mL	< 1,5 mL → hypospermie > 6 mL → hyperspermie
pH	7,2 - 8	
Concentration	> 15 millions/mL > 39 millions/ éjaculat	0 → azoospermie < 15 millions → oligospermie > 200 millions → polyspermie
Mobilité	> 30% de mobilité progressive (a+b)	< 30% → Asthénospermie
Morphologie	OMS-1999 : ≥ 30% de formes typiques (selon la classification David) OMS-2010 : ≥ 4% de formes typiques (selon la classification Kurger)	OMS-1999 (classification David) : < 30% → tératospermie OMS-2010 (classification Kurger) : < 4% → tératospermie
Vitalité	> 58% de formes vivantes	< 58 → nécrospermie
Agglutinats	Absence.	
Leucocytes	< 1 million/mL	> 1 million → leucospermie

I.6.4 Exploration hormonale. (Young et al., 2016)

L'exploration hormonale est essentielle car elle permet de dépister un grand nombre d'atteintes primitivement testiculaires (insuffisances testiculaires primitives, ITP) responsables d'azoospermie, d'oligospermie ou d'OAT. Un grand nombre d'ITP se traduisent en effet par une élévation anormale de la FSH (souvent associée à une baisse de l'inhibine B circulante), ce qui permet déjà de préciser le niveau testiculaire de l'atteinte et d'écartier les causes pré- et post-testiculaires évoquées plus haut.

La FSH joue un rôle dans la croissance testiculaire et le déclenchement de la spermatogenèse à la puberté, ainsi que dans la stimulation de l'activité mitotique de l'épithélium séminal. La LH stimule la synthèse d'hormones androgènes, notamment la testostérone élaborée par les cellules interstitielles, et agit sur l'apparition des caractères sexuels secondaires. Les

androgènes, notamment la testostérone, élaborés par les cellules interstitielles de Leydig diffusent dans l'épithélium séminal contrôlent l'activité des cellules de Sertoli et stimulent la spermatogenèse.

L'inhibine B a enrichi nos connaissances sur la fonction testiculaire et la régulation de l'axe hypophysio-gonadique dans un certain nombre de conditions génitales telles que la maturation et la sénescence, l'infertilité, l'hypogonadisme, l'administration de gonadotrophines, la contraception hormonale et les dommages testiculaires résultant de la radiothérapie ou de la chimiothérapie. L'inhibine B est une glycoprotéine hétérodimérique composée d'une sous-unité a commune et d'une sous-unité bB spécifique (Barbotin et *al.*, 2015). Chez l'homme, la protéine est produite exclusivement par les testicules. La production d'inhibine B est stimulée par la sécrétion de l'hormone folliculo-stimulante hypophysaire (FSH). L'inhibine B résultante exerce une rétroaction négative sur la sécrétion de FSH. L'inhibine B exerce également un effet intratesticulaire paracrine (Barbotin et *al.*, 2015). L'évaluation de la fonction testiculaire implique généralement une évaluation endocrinienne initiale, dans laquelle la FSH sérique et les niveaux de testostérone totale sont systématiquement mesurés. Lorsqu'ils sont mesurés, les niveaux d'inhibine B sont assez bien en corrélation avec les concentrations de FSH dans la grande majorité des cas. Cependant, la précision diagnostique de la FSH est limitée par le fait que certaines conditions ne conduisent pas à des changements dans la sécrétion de FSH (Barbotin et *al.*, 2015). La FSH et l'inhibine B sont des outils complémentaires dans les conditions gonadiques masculines et le diagnostic andrologique. En particulier, la FSH et l'inhibine B ensemble sont plus sensibles que l'une ou l'autre seule pour prédire l'état histologique des testicules et la présence de spermatozoïdes dans les tissus bioptiques (Barbotin et *al.*, 2015).

I.7 Infertilité masculine et stress oxydatif

I.7.1 Production intrinsèque d'ERO

Le métabolisme aérobie dans les cellules crée les ERO comme sous-produit. Le processus de phosphorylation oxydative mitochondriale utilise la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) comme donneur d'électrons et l'O₂ comme accepteur d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons, en associant à la fois la réduction et les réactions d'oxydation avec la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP). Ces réactions redox se produisent dans les mitochondries avec 1 – 5% d'O₂ consommé par le métabolisme aérobie transformé en ERO comme un sous-produit (Boveris et *al.*, 1973). Une autre source intrinsèque de la production

d'ERO spermatiques est la glucose-6-phosphate déshydrogénase cytoplasmique (G-6-PPH). Cette source cytoplasmique d'ERO peut expliquer pourquoi l'augmentation du cytoplasme spermatique pourrait être liée à l'infertilité (Gomez et *al.*, 1996). Les leucocytes spermatiques sont une autre source intrinsèque d'ERO, produisant jusqu'à 1000 fois plus d'ERO que le métabolisme aérobie (Plante et *al.*, 1994). L'infection a également été impliquée comme une source d'ERO, car l'inflammation et l'infection peuvent attirer des leucocytes dans la région touchée. La prévalence de l'infection subclinique chez les hommes infertiles varie entre 10% et 35% (Henkele et *al.*, 2011 ; Trum et *al.*, 1998). Les ERO sont plus élevés chez les patients atteints d'infections des glandes accessoires mâles (IGAM), y compris l'urètre, la prostate, les vésicules séminales, les conduits d'ajournement, les glandes de Cowper, l'épididyme ou les testicules (Depuydt et *al.*, 1996). La définition de IGAM est basée sur les critères de l'OMS de l'oligo-, de l'astheno-ou de la tératozoospermie avec une combinaison des critères suivants: (i) antécédents d'infection urinaire, épидидymite, ou maladie transmise sexuellement, ou des résultats physiques d'anomalies rectales anormales examen, épидидyme ou canal déférent épaissis ou tendre, (II) liquide prostatique anormal ou urine après examen de la prostate, (III) éjaculat anormal comprenant leucocytes positifs de peroxydase, culture avec des bactéries pathogènes, ou plasma séminal anormal (Depuydt et *al.*, 1996). Les patients atteints de varicocèles ont un facteur de stress oxydatif plus élevé et des niveaux plus élevés de lésions d'ADN spermatiques induites par les EOR (Wright et *al.*, 2014). Ces patients ont amélioré les paramètres de sperme après le traitement de leur varicocèle (Wright et *al.*, 2014). Il n'y a pas seulement amélioration des paramètres de sperme après la varicocelectomie, mais aussi une diminution des niveaux de peroxydation lipidique séminale et des lésions de l'ADN du sperme (Ni et *al.*, 2016). Les varicocèles provoquent également une température scrotale plus élevée (Ni et *al.*, 2016). La chaleur a été associée de façon indépendante à l'augmentation des ERO dans l'analyse du sperme ainsi qu'à d'autres changements négatifs dans les facteurs de sperme (Rao et *al.*, 2015; Tremellen et *al.*, 2008).

Une autre cause médicale importante d'ERO est l'hyperglycémie. Les patients atteints de prédiabète ou de diabète sucré ont également augmenté le stress oxydatif avec une forte corrélation des dommages oxydatifs et une diminution de la qualité du sperme (Oliveira et *al.*, 2015).

I.7.2 Facteurs extrinsèques d'ERO

Les expositions industrielles, bien que peu courantes, sont une cause d'augmentation de la production d'ERO et des lésions de l'ADN du sperme. L'exposition aux métaux lourds

(cadmium, plomb, fer et cuivre), aux pesticides, au phtalate et à la pollution peut causer des lésions au spermatozoïde (Tremellen et *al.*, 2008). Des études multiples montrent que l'exposition industrielle aux toxiques diminue la fonction des spermatozoïdes et augmente les dommages de l'ADN. Les pesticides et les phtalates induisent non seulement le stress oxydatif, mais peuvent aussi perturber l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique dans les modèles animaux (Queiroz et *al.*, 2006). L'inhibition de la GnRH inhibe la libération de la LH et de la FSH. Il en résulte une inhibition de la gamétogenèse et de la stéroïdogénèse, conduisant à des effets délétères sur la fonction du sperme ainsi que l'atrophie testiculaire.

Le tabagisme a également été associé à une diminution de la fonction spermatique. Le tabagisme est associé à des diminutions significatives de la densité du sperme, du nombre total de spermatozoïdes, de la motilité du sperme et de la morphologie du sperme (Sharma et *al.*, 2016). L'usage du tabac a également été corrélé avec des niveaux plus élevés de lésions de l'ADN du sperme (Bisht et *al.*, 2017). Le tabagisme incite à l'inflammation locale et est associé à une augmentation de 48% des leucocytes séminaux et à une augmentation de 107% des niveaux d'ERO séminal (Saleh et *al.*, 2002).

Une consommation excessive d'alcool conduit à une augmentation de l'acétaldéhyde, un sous-produit du métabolisme de l'éthanol, qui interagit avec les protéines et les lipides générant ERO (Agarwal et *al.*, 2014).

L'apport excessif d'éthanol est également associé à des spermatozoïdes morphologiquement anormaux, à des réductions de la spermiogénèse, à une diminution du volume du liquide séminal, à une faible LH, à la FSH et à la testostérone, et à une augmentation du stress oxydatif (La Vignera et *al.*, 2013).

Les patients ayant des antécédents de malignité sont à un risque plus élevé de stress oxydatif en raison de l'exposition aux radiations et à la chimiothérapie. Les hommes qui sont exposés à une chimiothérapie gonadotoxique, comme le cisplatine, la doxorubicine ou le cyclophosphamide subissent un stress oxydatif accru, possiblement médiatisé par des protéines de choc thermique (Tiligada et *al.*, 2006). L'exposition aux radiations provoque des dommages causés par la peroxydation lipidique déclenchée par les ERO (Manda et *al.*, 2007). Le rayonnement de faible niveau augmente également les ERO en augmentant la NADH oxydase conduisant à une augmentation de la mort du sperme (Desai et *al.*, 2009). Un résumé des facteurs affectant la production d'ERO est fournie à la Figure 10

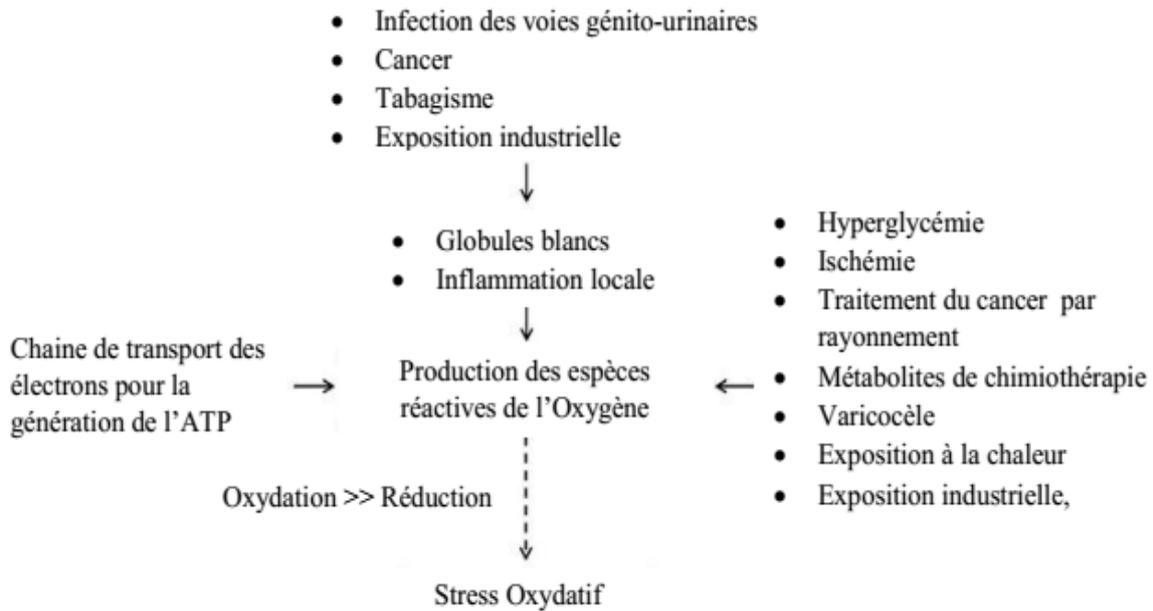


Figure 10: Cause physiologiques et pathologiques de la production d'ERO.

I.7.3 Rôle physiologique des ERO sur le spermatozoïde

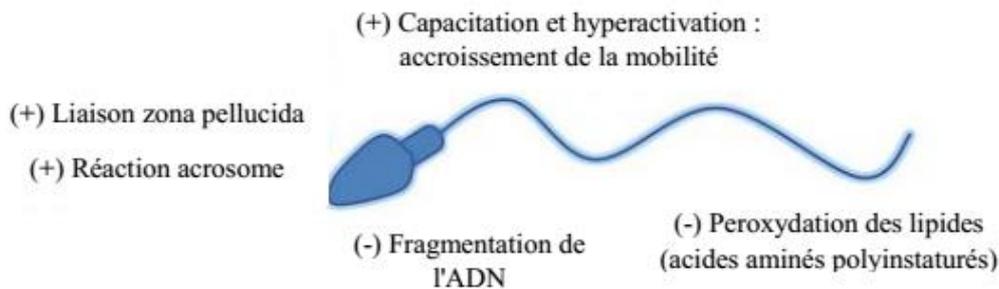


Figure 11: Role Physiologique (+) et pathologique (-) de l'oxydation sur les spermatozoïdes.

Pour une qualité optimale des paramètres du sperme, il doit y avoir un équilibre entre les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) et les antioxydants (Figure 11). Les ERO induisent la production d'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) dans les spermatozoïdes qui inhibe la tyrosine phosphatase conduisant à la phosphorylation de la tyrosine (O'Flaherty et *al.*, 2006). En particulier, le H₂O₂ stimule la capacitation via la phosphorylation de la tyrosine déclenchant une cascade de signalisation cellulaire (Aitken et *al.*, 1995). La capacitation nécessite non seulement des ERO, mais elle peut être inhibée par la catalase (CAT) (Aitken et *al.*, 1995). On a décrit que des niveaux élevés d'ERO favorisent la réaction acrosome, alors que la présence de CAT ou de superoxyde dismutase (SOD) inhibe la réaction acrosome (Lamirande et *al.*, 1998). Le mécanisme d'induction de la réaction acrosome semble être la phosphorylation de la tyrosine modulée par les ERO (Aitken et *al.*, 1995). La mobilité peut

également être affectée par les ERO. L'hyperactivation est augmentée lorsque les spermatozoïdes sont exposés aux ERO (Lamirande et *al.*, 1993). La phosphorylation de la tyrosine induite par les ERO dans le flagelle provoque une hyperactivation (Wright et *al.*, 2014 ; O'Flaherty et *al.*, 2006). La phosphorylation de la tyrosine augmente également la liaison de la membrane du spermatozoïde à la protéine Zona pellucide ZP-3, favorisant la fusion des spermatozoïdes et des ovocytes (Aitken et *al.*, 1995).

I.7.4 Effets pathologiques des ERO sur les spermatozoïdes.

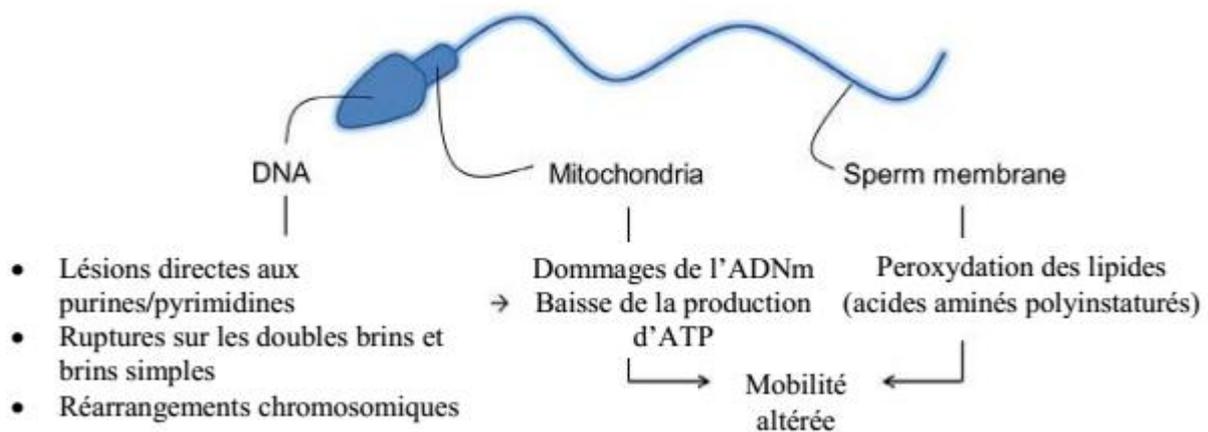


Figure 12: Stress oxydatif et les dommages causés à l'ADN, à la mitochondrie et la membrane plasmique des spermatozoïdes.

Bien que les ERO soient nécessaires à la fonction physiologique normale du spermatozoïde, le stress oxydatif excessif peut entraîner une susceptibilité accrue des lésions de l'ADN, conduisant potentiellement non seulement à l'infertilité, mais également une perte récurrente de grossesse ou des mutations génétiquement héréditaires causant des maladies pédiatriques (Dinesh et *al.*, 2012). En raison de la grande susceptibilité au stress oxydatif du spermatozoïde dû à sa teneur en acides gras insaturés, de vastes dommages membranaires peuvent survenir. Une fois l'oxydation lipidique commencée, les doubles liaisons d'un acide gras insaturé sont attaquées par un radical libre pour créer un radical peroxyde lipidique. Le radical peroxyde lipidique réagit avec la molécule lipidique voisine déclenchant une réaction en chaîne qui peut conduire à une oxydation de > 50% de la membrane plasmique du spermatozoïde (Kothari et *al.*, 2010). Finalement, la peroxydation lipidique s'arrête une fois que deux radicaux lipidiques réagissent les uns avec les autres, atteignant ainsi la stabilité (Kothari et *al.*, 2010). Les sous-produits de l'oxydation lipidique comprennent les molécules mutagènes et génotoxiques malondialdéhyde (MDA) et 4 hydroxy-nonéanal (4-HNE) conduisant

indirectement à des dommages à l'ADN (Bisht et *al.*, 2017). Les radicaux libres ont la capacité d'endommager directement l'ADN du spermatozoïde en attaquant les bases de la purine et de la pyrimidine (Geva et *al.*, 1998). Les ERO causent des dommages par des ruptures d'ADN simple et double brin, des liaisons croisées et des réarrangements chromosomiques (Bisht et *al.*, 2017). La majeure partie du génome du sperme (85%) est liée aux nucléoprotamines centrales qui le protègent contre les attaques de radicaux libres (Bisht et *al.*, 2017). Les hommes infertiles ont souvent des lacunes en protamination, qui peut rendre l'ADN de leur spermatozoïde plus vulnérable aux dommages des ERO (Oliva et *al.*, 2006). Un autre mécanisme de lésions de l'ADN spermatique est l'apoptose initiée par des radicaux libres, conduisant à la destruction de l'ADN par les caspases (Tremellen et *al.*, 2008). Les spermatozoïdes ont une capacité limitée à réparer l'ADN et ne peuvent effectuer des réparations que pendant les stades spécifiques de la spermatogenèse (Marcon et *al.*, 2004). Une diminution de la mobilité a été montrée due à l'induction des ERO, principalement induite par le H₂O₂, la peroxydation des lipides dans la membrane du spermatozoïde diminuant la souplesse et l'inhibition des mécanismes de mobilité (Morielli et *al.*, 2015). La réduction de la mobilité des spermatozoïdes est proportionnelle à la quantité de peroxydation lipidique (Morielli et *al.*, 2015). Les dommages causés par les ERO de l'ADN mitochondrial entraînent une diminution de la disponibilité de l'ATP et de l'énergie, entravant la motilité des spermatozoïdes (Lamirande et *al.*, 1992). Des études ont montré des niveaux plus élevés d'ERO chez les patients atteints d'oligospermie (Agarwal et *al.*, 2014). Des niveaux élevés d'ERO perturbent les membranes mitochondriales, conduisant à l'activation des caspases et finalement à l'apoptose (Agarwal et *al.*, 2008). La libération du cytochrome c au cours de la voie apoptotique augmente les ERO, la promotion des dommages de l'ADN et la fragmentation, et potentiellement augmenter le cycle apoptotique (Thomson et *al.*, 2009). Les spermatozoïdes avec des niveaux plus élevés de stress oxydatif, en particulier après les cycles de gel/dégel, ont des niveaux plus élevés d'activation de la caspase qui peut déclencher l'apoptose (Paasch et *al.*, 2004).

I.7.5 Rôle physiologique des antioxydants

Pour maintenir les mécanismes oxydatifs physiologiques tout en minimisant le risque de lésion cellulaire, un équilibre entre ERO et antioxydants est nécessaire. Les antioxydants sont des agents réducteurs qui réagissent avec et tamponne les ERO et sont considérés comme une forme de défense contre le stress oxydatif (Sies et *al.*, 1993). Ils sont classés en tant qu'agents enzymatiques ou non enzymatiques (Sies et *al.*, 1993), avec des agents non enzymatiques

subdivisés en ceux qui sont produits de façon endogène ou consommés par des aliments ou des suppléments (Figure 13).

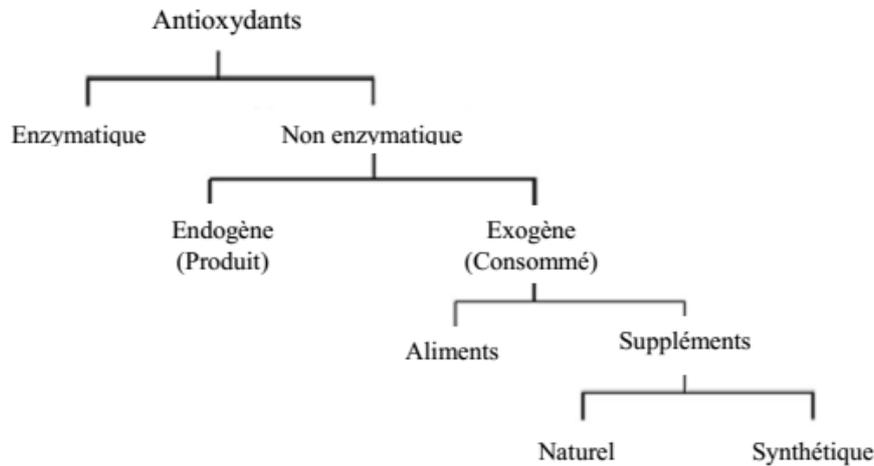


Figure 13: Catégorisation des anti-oxydants

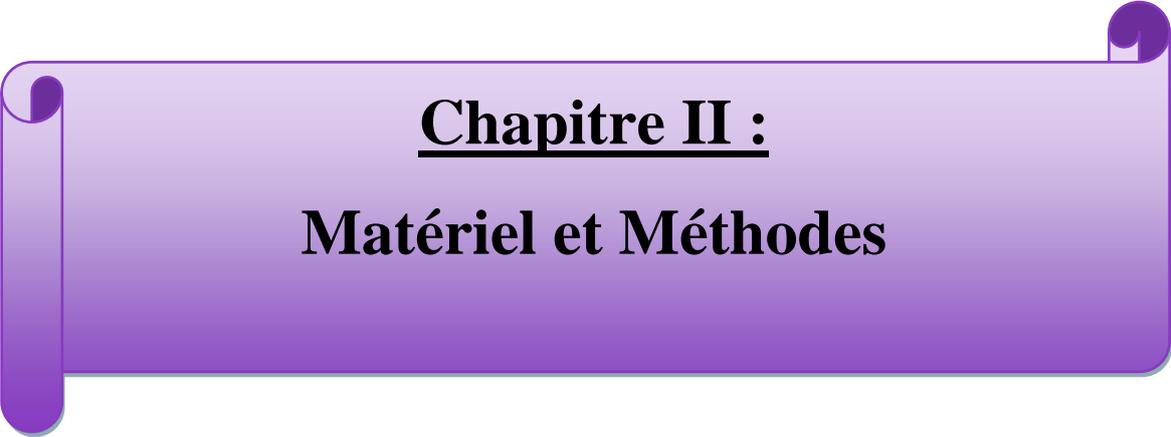
L'incubation *in vitro* de spermatozoïdes en l'absence de plasma séminal montre une augmentation significative des marqueurs du stress oxydatif et une réduction de la mobilité après 2 h (Kobayashi et al., 1991). Le plasma séminal chez les hommes avec infertilité idiopathique aurait un taux d'antioxydants inférieures aux hommes fertiles (Alkan et al., 1997).

Les antioxydants enzymatiques importants dans l'infertilité sont la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX) et la catalase (CAT). La SOD nettoie l'anion superoxyde et catalyse sa conversion en H_2O_2 and O_2 . Des niveaux élevés de SOD ont été trouvés dans les cellules de Sertoli, tandis que les cellules germinales ont des niveaux d'activités élevés qui sont maintenus pendant la spermatogenèse dans le développement et la maturation des spermatozoïdes (Bauche et al., 1994). La SOD a également été identifiée dans l'épididyme et dans le plasma séminal (Chen et al., 2003). Cette enzyme diminue les marqueurs du stress oxydatif (Kobayashi et al., 1991), protège le spermatozoïde contre la peroxydation lipidique (Tavilani et al., 2008), diminue les lésions de l'ADN (Chen et al., 2003) et est associée à la mobilité chez les spermatozoïdes humains (Kobayashi et al., 1991). La GPx utilise le glutathion comme donneur d'électrons pour catalyser le H_2O_2 et l'anion superoxyde (Tavilani et al., 2008). Des niveaux élevés de GPx sont présents dans les cellules de Sertoli (Bauche et al., 1994). La GPx est exprimée et sécrétée par la tête de l'épididyme et se trouve dans le sperme (Chen et al., 2003). La GPx protège principalement contre la peroxydation lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes (Tavilani et al., 2008).

La catalase (CAT) est une enzyme trouvée dans les peroxysomes qui convertit le H_2O_2 en H_2O et O_2 . Bien que la CAT est présente dans le développement du sperme, il y a un faible niveau d'activité constant dans le testicule (Bauche et *al.*, 1994). Les hommes atteints d'asthénozoospermie ont des niveaux inférieurs de CAT dans leur sperme par rapport aux hommes normospermiques (Jeulin et *al.*, 1989), démontrant potentiellement l'importance des concentrations plasmatiques séminales de CAT (Chen et *al.*, 2003 ; Jeulin et *al.*, 1989). Les antioxydants non enzymatiques sont produits ou consommés de façon endogène à partir d'aliments ou de suppléments. Le glutathion est un charognard de radicaux libres trouvé dans les niveaux élevés de spermatocytes en développement et spermatides (Bauche et *al.*, 1994) qui agit également comme une coenzyme pour le GPx. L'acide ascorbique (vitamine C) est une vitamine soluble dans l'eau qui neutralise les ERO et peut protéger contre les lésions de l'ADN dans le sperme (Lewis et *al.*, 1997). Le tocophérol (vitamine E) est une vitamine liposoluble qui réduit la peroxydation lipidique dans les spermatozoïdes (Lewis et *al.*, 1997). Le sélénium et le zinc sont des oligo-éléments. Le sélénium sert de cofacteur à certaines isoformes de GPx (Bisht et *al.*, 2017) et le zinc peut fournir une protection contre l'oxydation lipidique (Zago et *al.*, 2001). Le lycopène, un caroténoïde, est localisé à la prostate et aux testicules et peut se protéger contre les lésions tissulaires ischémiques – reperfusion (Hekimoglu et *al.*, 2009). Cependant, le lycopène n'a pas été détecté dans le sperme (Lewis et *al.*, 1997). L'ubiquinol, trouvé dans le plasma séminal, est la forme réduite de la coenzyme Q10 et a été associée à des niveaux inférieurs d'ERO et une augmentation correspondante du nombre de spermatozoïdes et de la mobilité (Alleva et *al.*, 1997).

I.7.6 Effets pathologiques des antioxydants

Malgré l'espoir que les antioxydants empêcheraient ou pourrait potentiellement réparer les dommages oxydatifs, la supplémentation non réglementée peut conduire à une abondance pathologique d'antioxydants causant un déséquilibre entre l'oxydation et la réduction. Le paradoxe antioxydant décrit comment les antioxydants peuvent exacerber les blessures par une perte de mécanismes oxydatifs, la promotion de lésions tissulaires, et une augmentation paradoxale d'ERO (Halliwell et *al.*, 2000). Comme discuté précédemment, l'oxydation joue un rôle nécessaire dans la reproduction masculine et la supplémentation antioxydante non réglementée peut inhiber ces mécanismes. Le surplus de CAT peut prévenir la capacitation en inhibant l'oxydation locale (Aitken et *al.*, 1995). De même, l'excès de SOD et de CAT peut empêcher la réaction de l'acrosome de se produire (Lamirande et *al.*, 1998).



Chapitre II :
Matériel et Méthodes

II.1 Matériel

- ✓ Matériel biologique : Il s'agissait essentiellement des échantillons de sang, sperme et sécrétions urétrales
- ✓ Réactifs, consommables et appareils : Voir annexe 3

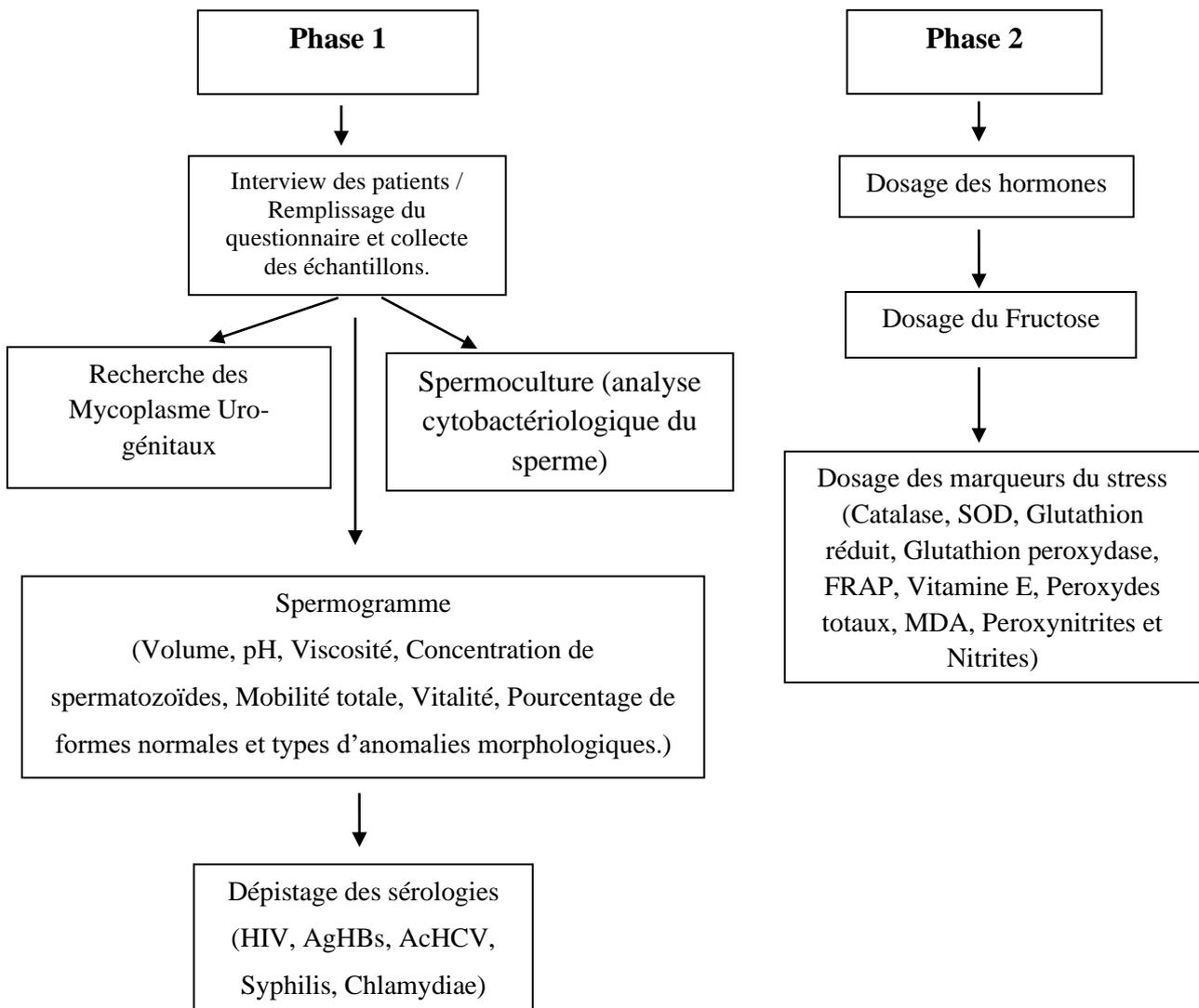
II.2 Méthodes

II.2.1 Type d'étude

Nous avons mené une étude transversale Cas-Témoin, prospective et multicentrique.

II.2.2 Durée de l'étude

Notre étude s'est déroulée d'Octobre 2015 à juillet 2017 avec deux phases :



II.2.3 Lieux de l'étude

Les patients ont été recrutés dans trois hôpitaux publics (Hôpital Central de Yaoundé, Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé, Hôpital Général de Yaoundé) et trois laboratoires privés de la ville de Yaoundé (Laboratoire Béthanie, Laboratoire d'analyses Médicales du Centre et Laboratoire GTAB). Ces derniers étant parmi les établissements de santé les plus fréquentés de la ville. Les analyses bactériologiques, sérologiques et spermogrammes ont été réalisés au sein du Laboratoire d'Analyses Médicales du Centre (LAMC). Le dosage des hormones a été réalisé au laboratoire de Biochimie du Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé (CHUY) tandis que celui du fructose et des marqueurs du stress a été réalisé au laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales (FMSB) de l'Université de Yaoundé I.

II.2.4 Recrutement des participants

✓ Population d'étude

Patients de sexe masculin venus faire un spermogramme dans une des structures suscitées.

○ Sélection des Cas

- **Critères d'inclusion** : Patients de sexe masculin, présentant au moins une anomalie du spermogramme, consentants à participer à l'étude.
- **Critères de non-inclusion** : Les patients recevant déjà un traitement pour leur condition.

○ Sélection des Témoins

- **Critères d'inclusion** : Patients de sexe masculin ne présentant aucune anomalie du spermogramme, consentants à participer à l'étude.

✓ Taille de l'échantillon

Elle a été calculée à partir de la formule de LORENTZ : $n = (T^2 \times P) (1-P) / m^2$.

- $T=1,96$ pour un intervalle de confiance de 95%.
- $P= 25\%$, est la prévalence de l'infertilité du couple au Cameroun.
- m =marge d'erreur à 5%.

$$n = (1,96^2 \times 0,25) \times (1-0,25) / (0,05^2) = 288,12.$$

Etant donné que l'infertilité masculine représente 40% de l'infertilité du couple notre taille devient $N = 288,12 \times 40 / 100 = 115,248$; soit **115 hommes**.

II.2.5 Processus de collecte de données

La collecte des données a été réalisée à travers une interview, basée sur un questionnaire validé. Le support de recueil des données était basé sur des questions simples qui nous ont permis d'obtenir les données sociodémographiques, l'histoire de la fertilité personnelle et familiale des patients (l'histoire du désir de grossesse, les analyses antérieures du sperme, les unions antérieures, leurs antécédents de procréation médicalement assistée, la consanguinité parentale, et le délai de concevoir des parents), leurs antécédents médicaux, leurs antécédents chirurgicaux, leur sexualité, et les habitudes alimentaires et comportementales. Par la suite nous avons réalisé des analyses biologiques tant sur le sérum, que sur les sécrétions urétrales.

II.2.6 Les prélèvements

✓ Prélèvement du sang

Les prélèvements de sang ont été effectués sur des patients à jeun depuis au moins dix heures. A l'aide d'une aiguille vacutainer, nous avons recueilli du sang veineux dans des tubes secs pour le dosage de l'Inhibine B, de la FSH, des sérologies HIV, AgHBs et anticorps HCV. Ces échantillons étaient ensuite centrifugés à 3000 tours /minute pendant 5 minutes puis, le sérum recueilli était stocké à -20°C lorsque l'analyse était différée.

✓ Prélèvement Urétral

Le prélèvement des sécrétions urétrales était obtenu par introduction d'un écouvillon stérile par le méat urinaire sur les deux premiers centimètres de l'urètre.

✓ Prélèvement du sperme

○ Conditions de prélèvement

Avant tout prélèvement de sperme, le patient devait non seulement observer une abstinence sexuelle de minimum 3 et maximum 5 jours, boire 1.5l d'eau la veille du prélèvement au soir et ne pas utiliser de préservatif lors du prélèvement.

○ Procédure

Après s'être lavé les mains avec de l'eau courante et du savon, le patient se vidait la vessie puis nettoyait le gland de son pénis avec du dakin ou autre solution antiseptique et ensuite le rinçait à l'aide d'eau distillée stérile. Le recueil de la totalité du sperme se faisait dans un pot stérile mécaniquement par masturbation. Enfin, le prélèvement devait être acheminé dans les 30min suivant le recueil.

II.2.7 Recherche de microorganismes impliqués dans l'infertilité.

II.2.7.1 Dépistage de la Syphilis, du SIDA, de l'hépatite B et de l'hépatite C.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande qu'on commence par un test de diagnostic rapide (TDR) qui est très sensible (99,2%-100%) et en cas de positivité confirmer le résultats par un test plus spécifique tel que la méthode d'ELISA (99,8%-100%).

II.2.7.1.1 Test de diagnostic rapide (TDR)

✓ Principe

Il était basé sur la capture des analytes (molécules qui sont indicatives de différents états) sur une surface solide puis en fixant des molécules à ces analytes pour permettre la détection à l'œil nu. L'analyte était soit mis en évidence par une méthode directe (détection des antigènes) ou indirecte (détection des anticorps) développés en réponse à une infection aiguë, chronique ou silencieuse. Le TDR repose essentiellement sur des techniques immunologiques et biochimiques tels que la méthode immuno-chromatographique (« lateral flow »), la méthode « Flow through », l'agglutination des particules, les méthodes immunoenzymatiques (ELISA sur membrane)

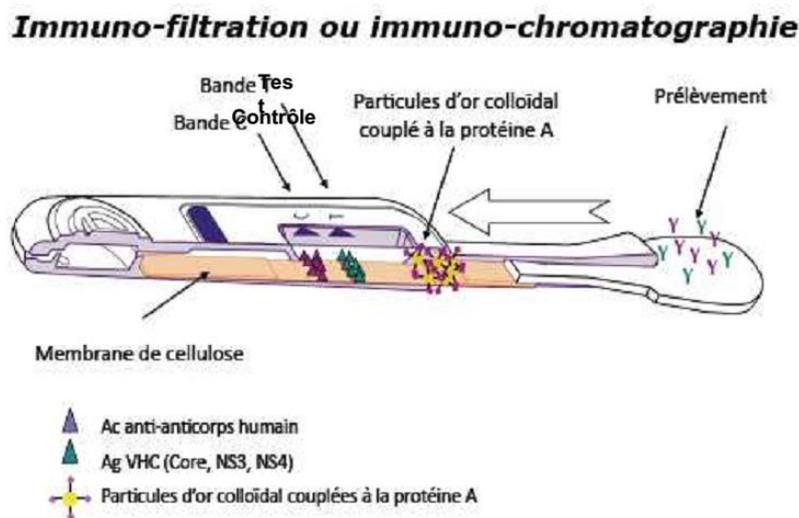


Figure 14 : Principe du test de diagnostic rapide. (Trimoulet, 2015)

✓ Mode opératoire

La première étape consistait à déposer l'échantillon de sang sur la partie absorbante ou alors plonger la partie absorbante de la bandelette dans l'échantillon tout en faisant attention de ne pas dépasser la limite indiquée. Enfin, la lecture des résultats se faisait dans les 20 à 30

minutes (Pas plus d'une Heure) après le dépôt de l'échantillon. L'exemple du dépistage du VIH (Figure 15) illustre bien ce paragraphe.



Figure 15: Procédure de dépistage de la sérologie HIV. (WHO, 2005)

✓ **Interprétations des résultats**

▪ **Négatif (une seule ligne visible)**

Lorsqu'une seule ligne rouge-violet apparaissait au niveau du point contrôle (C) dans le haut de la fenêtre rectangulaire, ceci démontrait que le test a été effectué avec succès, les réactifs fonctionnent et que la concentration en antigène HBs du patient est <1 U/ml. Même si la ligne de contrôle est faible, le test doit être considéré comme valide.

▪ **Positif (deux lignes visibles)**

Une seconde ligne rouge-violet de test (T) apparaissant dans la partie inférieure de la fenêtre rectangulaire des résultats indique que le résultat est positif ($AgHBs > 2$ U / ml). Même une faible ligne indique un résultat positif. Différentes intensités entre les lignes de test (T) et de contrôle (C) peuvent se produire, mais n'ont aucun effet sur l'interprétation du résultat.

- **Non valide (pas de ligne "C") :** Si aucune ligne de contrôle (C) n'apparaît, même si une ligne test (T) apparaît ; le test doit être répété à nouveau.

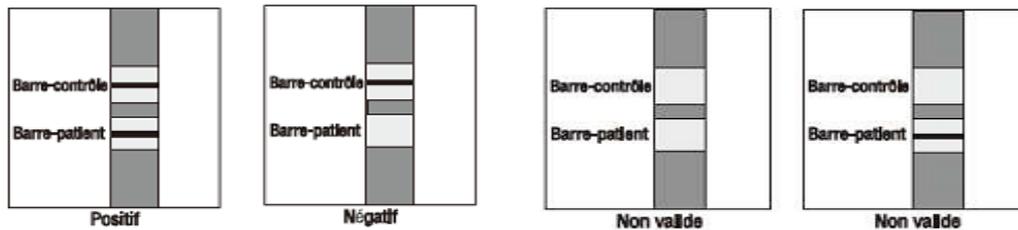


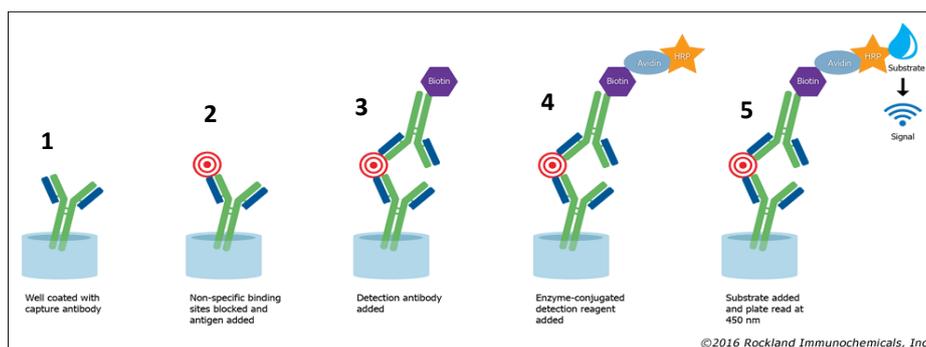
Figure 16: Interprétation des résultats du TDR sur bandelette ou cassette

II.2.7.1.2 Méthode d'ELISA

Les résultats positifs au TDR étaient confirmés par la méthode d'ELISA (plus spécifique).

✓ Principe

La méthode ELISA (« Enzyme Linked Immunosorbent Assay ») avait été utilisée pour la confirmation du test de diagnostic rapide. La technique ELISA est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. La figure ci-après illustre le principe de la méthode ELISA Sandwich :



Un ELISA en sandwich :

- (1) La plaque est recouverte avec un anticorps de capture ;
- (2) L'échantillon est ajouté, et tout antigène présent se lie à l'anticorps de capture ;
- (3) L'anticorps de détection est ajouté, et se lie à l'antigène ; les antigènes non fixés sont éliminés par lavage de lavage
- (4) L'anticorps secondaire lié à une enzyme est ajouté, et se lie à l'anticorps de détection ;
- (5) Le substrat est ajouté et est converti par l'enzyme en une forme détectable (colorée ou fluorescente)

Figure 17: Schéma résumant la technique ELISA

✓ Mode opératoire

Un anticorps de capture hautement spécifique du marqueur à doser était fixé sur les puits de la plaque de micro-titrage fournie pendant la fabrication. Après ajout des sera ou des solutions étalons, nous observions la liaison des échantillons du marqueur et des étalons connus aux anticorps de capture. Nous ajoutons une solution contenant un deuxième anticorps secondaire anti-marqueur biotinylé à l'analyte : il s'agissait de la solution de conjugué Horseradish Peroxidase (HRP). L'analyte se retrouvait pris en sandwich. Après incubation, tout excès

d'analyte non lié et d'anticorps secondaire était éliminé par une solution de lavage. Un substrat chromogène (Tétraméthylbenzidine ou TMB) était ajouté aux puits, ce qui entraînait le développement progressif d'un complexe de couleur bleue avec le conjugué. Le développement des couleurs était alors arrêté par l'ajout de la solution stop (H₂SO₄), le produit final était jaune. L'absorbance du complexe de coloration était ensuite mesurée à 450 nm. L'intensité du complexe coloré produit était directement proportionnelle à la concentration du marqueur présent dans les échantillons et les étalons. Les densités optiques générées pour chaque étalon étaient représentées en fonction de la concentration attendue formant une courbe. Cette courbe était ensuite utilisée pour déterminer avec précision la concentration du marqueur dans les échantillons testés.

II.2.7.2 Diagnostic indirect du Chlamydia : Technique Immunocomb (Orgenics, 2002)

✓ Principe

Elle était basée sur une réaction immunoenzymatique en phase solide : les dents d'un peigne (carte plastique) ont été sensibilisées avec de l'antigène de *Chlamydia trachomatis*. Nous disposons d'un bac dont le 1^{er} godet contenait le sérum à tester et les suivants les réactifs prêts à l'emploi. Chaque dent du peigne était imprégnée de la dilution du sérum puis après lavage le peigne était trempé dans le godet contenant un sérum anti-IgG humaine marqué par une enzyme : la phosphatase alcaline. Une lecture optique, en comparaison d'une gamme étalon (S1, S2, S3) permettait une évaluation semi-quantitative de la coloration des échantillons.

✓ Mode opératoire

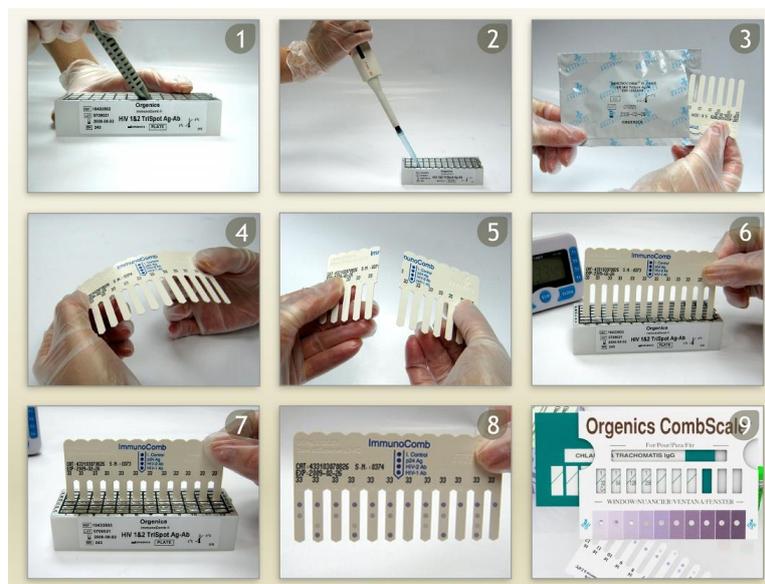


Figure 18 : Procédure de dépistage du Chlamydia par la technique immunocomb. (Orgenics, 2002)

Après avoir laissé revenir le matériel, les échantillons et les contrôles à température ambiante, nous perforions la rangée A et y ajoutions les contrôles et échantillons pré-dilués et mélangions. Ensuite nous retirions le peigne de l'emballage et vérifions qu'il était bien libellé. Lorsque nous avons moins de 12 échantillons à analyser, nous séparions le nombre de dents nécessaires et conservions le reste dans son paquet original. Nous insérons le peigne, mélangions dans la rangée A et incubions à 37°C. Après avoir perforé la rangée B, nous absorbions le liquide adhérent aux dents, insérons le peigne agitions dans la rangée B, incubions. Ensuite nous répétons le processus dans les rangées C, D et E. La réaction colorée se produisait dans la rangée F et les résultats étaient lus tel qu'indiqué à la figure 18.

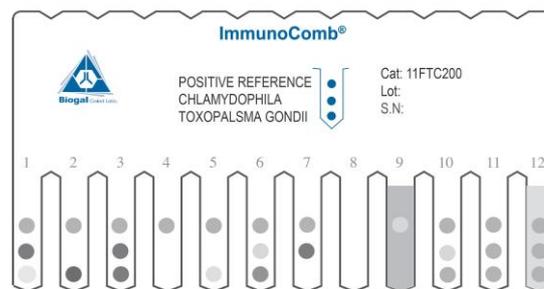


Figure 19: Lecture interprétative des résultats d'immunocomb. (Organics, 2002)

II.2.7.3 Recherche des mycoplasmes uro-génitaux (Bio-Rad, 2007)

Pour se faire, nous avons utilisé la plaque SIR MYCOPLASMA de *Bio-Rad* qui est un réactif conçu pour l'antibiogramme des mycoplasmes uro-génitaux : *Ureaplasma spp* (*Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*) et *Mycoplasma hominis* (Mh). Aujourd'hui, le diagnostic différentiel d'identification entre *Ureaplasma urealyticum* et *U. parvum* est difficile à réaliser. C'est une microplaque contenant 8 antibiotiques actifs sur ces bactéries et couramment utilisés dans le traitement des infections génitales. L'apparition de souches résistantes, en particulier aux cyclines et aux macrolides (antibiotiques utilisés en première intention), rend la pratique de l'antibiogramme indispensable pour éviter les échecs thérapeutiques. L'inoculum standardisé confère à cette technique une très bonne concordance avec la méthode de référence (Renaudin et *al.*, 1990).

✓ Principe

SIR MYCOPLASMA est un antibiogramme en milieu liquide où chaque antibiotique est présent à deux concentrations différentes (doxycycline, tétracycline, azithromycine, josamycine, érythromycine, ofloxacine) ou à une seule concentration (clindamycine, pristinamycine). Son principe repose sur l'inhibition métabolique. La croissance des mycoplasmes est objectivée par leur activité métabolique : hydrolyse de l'urée en bouillon U9

par *Ureaplasma spp* et hydrolyse de l'arginine en bouillon arginine par *Mycoplasma hominis* (Mh), avec libération d'ammoniaque qui alcalinise le milieu et fait virer du jaune au rouge l'indicateur de pH (rouge de phénol). Si le germe est sensible à l'antibiotique testé, son métabolisme est inhibé et le milieu reste jaune. Si le germe est résistant, il se développe et le milieu vire au rouge.

✓ **Mode opératoire**

Il s'agissait d'une barrette constituée de 2 rangées de 8 cupules dans lesquelles sont déposés les différents antibiotiques. Ils étaient réhydratés au moment de la distribution de l'inoculum. Les concentrations dans les cupules étaient alors voisines des concentrations critiques, ce qui permettait d'attribuer aux souches testées un profil de sensibilité traduit en : Sensible, Intermédiaire ou Résistant, pour chaque antibiotique.



- Doxycycline (4mg/L et 8 mg/L)
- Tétracycline (4mg/L et 8 mg/L)
- Azithromycine (2mg/L et 4mg/L)
- Josamycine (2mg/L et 8 mg/L)
- Erythromycine (1mg/L et 4 mg/L)
- Clindamycine (2mg/L)
- Pristinamycine (2mg/L)
- Ofloxacine (1mg/L et 4 mg/L)

Figure 20: Microplaque SIR. (Bio-Rad, 2007)

II-2-7-3 Réalisation de l'antibiogramme

L'antibiogramme pouvait être réalisé à partir du contenu de la cupule X de MYCOPLASMA DUO (code 62740) tel que décrit dans la figure 21. Dans notre cas, nous utilisons le schéma N°03.

✓ **Standardisation de l'inoculum**

Afin d'ensemencer l'antibiogramme avec un inoculum contenant 10^3 à 10^5 UCC/ml (Unité Changeant la Couleur) il était indispensable de faire une pré-culture du milieu ensemencé avec le prélèvement. Cette pré-culture, réalisée selon les protocoles décrits ci-après, conduisait à une multiplication des mycoplasmes jusqu'à un titre maximum de 10^6 à 10^7 UCC/ml. Une dilution au 1/100e de cette pré-culture, en bouillon U9 ou en bouillon arginine suivant l'espèce isolée, réalisait un inoculum standardisé.

✓ **Distribution de l'inoculum standardisé**

Cent microlitres μl de l'inoculum standardisé était distribué (dilution au $1/100^{\text{e}}$ de la préculture, en bouillon U9ou arginine) dans chaque cupule de la microplaque SIR, puis la microplaque était recouverte avec l'adhésif et incubée à 37°C pendant 48 heures.

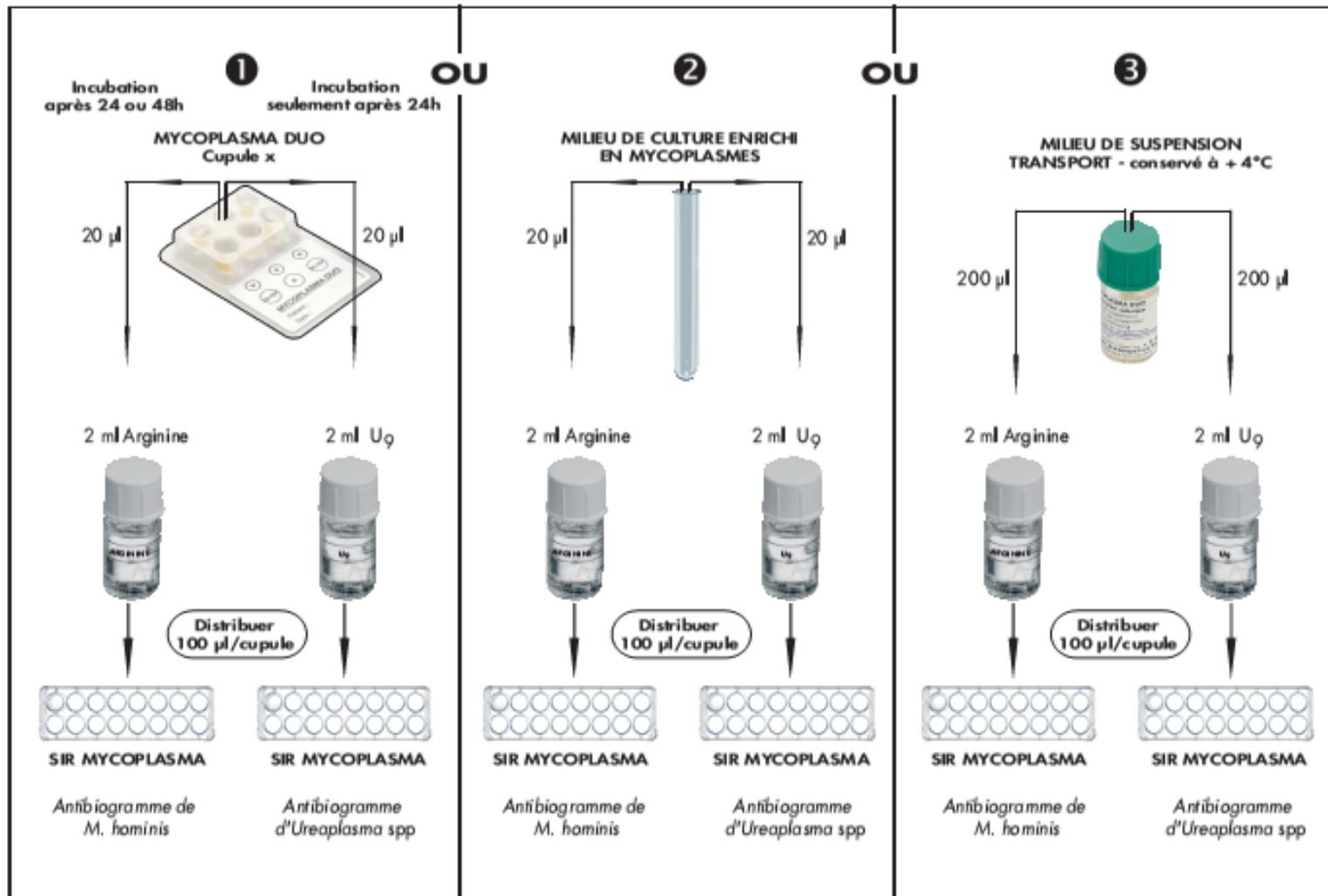


Figure 21: Mode opératoire SIR MYCOPLASMA. (Source : Bio-Rad, 2007)

✓ **Interprétation des résultats**

L'interprétation de l'antibiogramme se faisait dès que les cupules témoin de Croissance ont viré du jaune au rouge. Nous réalisons une lecture à 24 h et une autre à 48 h, la lecture à 48 h permettant de déceler les résistances de bas niveau pour les cyclines (19), de confirmer tout résultat lorsque l'inoculum de départ pouvait s'avérer faible (10^3 UCC/ml) ou lorsque le virage était apparu douteux en 24 heures.

Tableau V: Interprétation des résultats de l'antibiogramme SIR MYCOPLASMA

2 cupules jaunes :	Absence de croissance Souche sensible
2 cupules rouges :	Croissance en présence d'antibiotique Souche résistante
La cupule à faible concentration d'antibiotique : rouge La cupule à forte concentration d'antibiotique : jaune	Souche intermédiaire

- Pour la clindamycine et la pristinamycine (une seule concentration), 2 résultats seulement étaient possibles : Sensible ou Résistant.

✓ **Contrôle de qualité**

Le contrôle de qualité était réalisé à partir d'une souche de collection lyophilisée (*Ureaplasma parvum* ATCC 700970). Remettre en suspension la souche lyophilisée avec 1 ml de milieu U9 reconstitué (référence 62762) au préalable. Réaliser une dilution au 1/10^{ème} dans un nouveau milieu U9 reconstitué au préalable. Incuber ce milieu U9 ensemencé à 37°C pendant 18 heures sous atmosphère aérobie. A partir de ce milieu U9 enrichi en Ureaplasmes, réaliser une dilution au 1/100^{ème} (prélever 20 µl du milieu et les transférer dans un bouillon U9 de 2 ml reconstitués). L'ensemencement de la galerie SIR MYCOPLASMA est réalisé selon le protocole habituel à savoir 100 µl dans chaque cupule. Recouvrir la galerie avec un adhésif et incuber à 37°C pendant 48 heures. L'interprétation de la galerie est possible si les cupules du témoin de croissance ont viré du jaune au rouge. Le profil attendu est le suivant :

Tableau VI: Profil de sensibilité naturelle attendue

Témoin croissance	Témoin croissance	DO 4-8 mg/L	TE 4-8 mg/L	JM 2-8 mg/L	AZM 2-4 mg/L	E 1-4 mg/L	CM 2 mg/L	PT 2 mg/L	OFX 1-4 mg/L
+	+	S	S	S	S	S/I	R	S	S/I

II.2.8 Analyse du sperme

II.2.8.1 Analyse Cytobactériologique du sperme (spermoculture)

La spermoculture est un examen microbiologique permettant de détecter une infection au sein du sperme. C'est aussi un examen d'aide au diagnostic de certaines infections (induisant ou non à un problème de fertilité masculine). La méthode décrite ci-dessous est inspirée de celle décrite par Auroux et *al.*, 1988 ; Auroux et *al.*, 1989.

✓ **But**

L'examen bactériologique du sperme a pour but le diagnostic d'une infection génitale haute (infection des testicules, prostatite), le contrôle de la qualité du sperme afin de s'assurer que le sperme n'est pas infecté et normalement fécondant et de définir au mieux la part de responsabilité masculine dans le bilan de l'infertilité du couple.

✓ **Principe**

L'analyse consiste en un examen microbiologique du sperme basé sur la numération des leucocytes, la recherche des levures ou des parasites tels que *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, la recherche de façon systématique de la présence de *Staphylocoques* et *Streptocoques*. Pour se faire, nous effectuons une identification bactérienne suivi d'un antibiogramme si la culture est positive afin de trouver le bon antibiotique en cas d'infection.

✓ **Mode opératoire**

○ **Examen macroscopique**

L'examen macroscopique consistait à noter la couleur du sperme, le volume de l'éjaculat, le pH, la viscosité, la durée de liquéfaction, et l'odeur.

○ **Examen microscopique**

L'examen direct se faisait en plusieurs étapes à savoir :

- **L'état frais** entre lame et lamelle pour la mise en évidence de leucocytes, des hématies, des cellules, et des parasites.
- **L'état coloré** : il se faisait grâce à la coloration de Gram et du bleu de méthylène.

La coloration de Gram était basée sur l'affinité tinctoriale des bactéries et se faisait en 4 étapes principales : après coloration par le violet de gentiane, le mordantage par le lugol, la décoloration par l'alcool, nous terminions par la recoloration par la Fuchsine.

Le bleu de méthylène était utilisé pour la coloration des leucocytes, parasites et cellules. Entre autres, il était utilisé pour des tests de viabilité cellulaire : après application du colorant, les cellules vivantes restaient incolores, alors que les cellules mortes devenaient bleues. Ceci est lié au fait que la couleur du bleu de méthylène est déterminée par son état redox : quand il est sous sa forme oxydée, il est bleu, mais sous sa forme réduite, il est incolore. Or, le cytoplasme des cellules vivantes est un environnement réducteur : c'est une condition essentielle à la fabrication d'énergie, aussi bien par les bactéries que par les cellules eucaryotes. Le bleu de méthylène rentre dans toutes les cellules sur lesquelles on l'applique ; mais, dans les cellules vivantes, il est très rapidement réduit et devient donc invisible. C'est pour cette raison que seules les cellules mortes (et, par conséquent, les cellules fixées) se colorent en bleu lors de cette manipulation.

✓ **La culture**

La culture se faisait par ensemencement du sperme dans différents milieux de culture, à savoir :

- Une gélose au sang cuit pour l'identification des *haemophilus* ;
- Une gélose Chapman pour l'isolement des *staphylocoques* ;
- Une gélose Mac conkey ou EMB (Eosine Bleu de Méthylène) pour les *entérobactéries* ;
- Un milieu ordinaire ou BCP (gélose lactosée au bromocrésol pourpre) pour l'isolement non sélectif en particulier pour les entérobactéries ;
- Un milieu de sabouraud + chloramphénicol pour l'isolement sélectif des champignons ;
- Une gélose au sang frais + acide nalidixique (ANC) pour l'isolement sélectif des *streptocoques* ;

La lecture des boîtes de Pétri se faisait après 24 heures d'incubation puis l'identification de la ou les bactéries retrouvées s'en suivait. L'identification de la bactérie prenait en considération son aspect macroscopique, microscopique, et ses caractéristiques biochimiques.

✓ **Réalisation de l'antibiogramme (EUCAST, 2019)**

L'antibiogramme est un test qui met en évidence la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Pour se faire, nous avons utilisé la méthode de diffusion conformément aux recommandations du comité d'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Les milieux de culture

étaient préparés selon les recommandations du fabricant (Annexe 3). L'inoculum standardisé était préparé à partir d'une culture pure de 24 à 48 heures de bactéries obtenues sur Mueller-Hinton. La suspension était vigoureusement agitée sur un vortex puis, ajustée à 0,5 McFarland par addition de solution saline physiologique, ce qui correspond à un inoculum d'environ $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/ml pour *Escherichia coli*. Après 15 minutes, le milieu était strié par tamponnement, puis 15 minutes plus tard les disques d'antibiotiques étaient déposés. Par la suite, la préparation était laissée 15 minutes pour la pré-diffusion et incubée à 37 ° C. La lecture et interprétation des résultats se faisait après 24 heures d'incubation.

II.2.8.2 Spermogramme (WHO, 2010; Adelman et al., 1989)

- ✓ **But** : Il permet l'étude des paramètres quantitatifs et qualitatifs du sperme
- ✓ **Mode opératoire**

À la suite de la liquéfaction, des caractéristiques du sperme étaient déterminées à savoir les caractéristiques physiques et les caractéristiques microscopiques.

- **Caractéristiques physiques et chimiques**
 - **Couleur et liquéfaction**

La couleur normale du liquide séminal est gris opalescent. Une fois délivré, le sperme coagule puis se liquéfie. La liquéfaction est complétée dans les 30 minutes à la température corporelle (37°C). La coagulation est effectuée par les enzymes de la prostate qui agissent sur le fibrinogène produit par les vésicules séminales en créant un maillage très dense emballé. Une coagulation du sperme de rupture, ainsi que d'un faible volume indiquent un dysfonctionnement des vésicules ou leur agénésie (absence). Avant de commencer l'analyse du sperme, une période de temps devait être accordée pour la liquéfaction. Le délai normal de liquéfaction varie de trente minutes à une heure. Si celle-ci n'était pas réalisée dans ce délai, on disait qu'elle était lente plutôt que normale.

- **Le volume**

Le volume était mesuré à l'aide d'une pipette ou d'un cylindre gradué et était normalement compris entre 2 et 5mL.

- **La viscosité**

Elle s'évaluait selon 4 niveaux à l'aide d'une pipette :

- Viscosité normale : si l'échantillon se séparait bien goutte à goutte ;
- Viscosité 1 : si l'échantillon formait un filet liquide entre chaque goutte ;
- Viscosité 2 : si l'échantillon était suffisamment visqueux pour que le filet soit continu ;

- Viscosité 3 : si l'échantillon était tellement visqueux qu'il ne peut s'écouler par la pipette.

- **Le pH**

Le liquide séminal à normalement un pH alcalin qui oscille entre 7,5 et 8,0. Le pH était mesuré à l'aide de papier pH.

- **Caractéristiques microscopiques**

- **La mobilité**

Pour évaluer la mobilité, un examen à l'état frais était effectué ; il consistait à placer 10 microlitres (μL) de sperme entre une lame et une lamelle et de réaliser un décompte en visualisant au moins 200 spermatozoïdes. L'évaluation des grades se faisait comme suit :

- Grade A: progression rapide : les spermatozoïdes bougeaient bien en ligne droite à travers le champ du microscope;
- Grade B: progression lente : les spermatozoïdes bougeaient lentement, en zigzagant;
- Grade C : agitation sans progression : les spermatozoïdes bougeaient mais n'avancent pas (seules les flagelles bougent);
- Grade D: immobiles : les spermatozoïdes étaient complètement immobiles.

- **La viabilité - Coloration Éosine-Nigrosine**

- **Principe**

Cette coloration est basée sur le principe de la perméabilité des cellules mortes à certains colorants comme l'éosine (membranes plasmiques lésées). Grâce à un décompte de 200 spermatozoïdes, le pourcentage de spermatozoïdes vivants était évalué. Les spermatozoïdes viables en blanc ont une membrane qui n'est pas lésée, c'est-à-dire qu'ils résistent à la coloration à l'éosine, tandis que ceux en rouge ont une membrane lésée permettant à l'éosine de pénétrer à l'intérieur de la cellule. Quant à la nigrosine, elle servait seulement à colorer le fond du frottis.

- **Mode opératoire**

Après avoir mélangé 2 gouttes de sperme à 2 gouttes de solution aqueuse à l'éosine 1% au vortex, nous attendions 30 secondes avant d'ajouter 2 gouttes de solution aqueuse à la nigrosine 10 %. Une goutte du mélange obtenu était déposée entre une lame et une lamelle et un décompte de 200 spermatozoïdes se faisait à objectif 40x.

- **La numération**
- **Principe**

Cette étape permet de déterminer la concentration de spermatozoïdes dans l'éjaculat à analyser. Les résultats s'expriment en million/L (SI). Le tableau XVIII ci-dessous nous permettait de choisir la bonne dilution pour effectuer la numération :

Tableau VII: Dilution pour la numération des spermatozoïdes. (Source : Dussault, 2009)

Type d'échantillon	Diluton	Volume de diluant	Volume de sperme	Facteur ajustement
Oligospermie sévère	/	/	Goutte échantillon pure	N ^{bre*} /20
Oligospermie	1/10	180 µL	20 µL	N ^{bre*} /2
Normal	1/20	190 µL	10 µL	N ^{bre*}
Décompte élevé (donneur)	1/40	390 µL	10 µL	N ^{bre*} x 2
		195 µL	5 µL	

*N^{bre} : nombre de spermatozoïdes comptés dans les 5 carrés de l'hématimètre (4 coins + centre).

- **Mode opératoire**

Après avoir effectué une dilution de 1 sur 20 (10 µL de sperme avec 190 µL de liquide immobilisant), nous comptons les spermatozoïdes en examinant les 4 coins (A, C, G, I) + le centre du carré ; Pour ce faire, la dilution était étalée sur un hématimètre des 2 côtés et laissée au repos dans une chambre humide (boîte de Pétri) 10 minutes avant d'en faire la lecture;

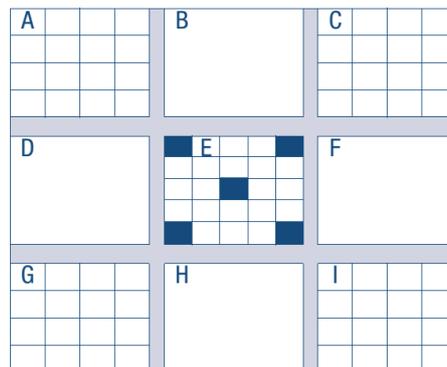


Figure 22: L'hématimètre. (Dussault, 2009)

Le nombre de spermatozoïdes comptés X 1000 nous donnait directement le nombre en million par litre.

$$N^{\text{bre}} \text{ de spermatozoïdes/l} = \frac{N^{\text{bre}} \text{ de spermatozoïdes comptés} \times \text{dilution} \times 10}{N^{\text{bre}} \text{ de mm}^2 \text{ comptés}}$$

▪ La morphologie

La morphologie des spermatozoïdes était évaluée après coloration d'un frottis et examen de celui-ci au microscope. Nous avons eu recours à la coloration à l'Hématoxyline + Éosine puis, un décompte d'au moins 200 spermatozoïdes était effectué avant d'établir une moyenne. Les résultats étaient exprimés en pourcentage (%).

• Principe

La coloration hématoxyline éosine (HE) est une coloration bichromatique qui se compose d'un colorant nucléaire, l'hématoxyline, et d'un colorant cytoplasmique, l'éosine. L'hématoxyline est un colorant cationique, dit également basique, qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés négativement (= anioniques ou acides) dits basophiles. Il colore notamment les noyaux en bleu/violet, en se fixant sur les acides nucléiques. A contrario, l'éosine est un colorant anionique, dit également acide, qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés positivement (= cationiques ou basiques) dits éosinophiles. Il colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge plus ou moins vifs selon leur acidophilie.

• Mode opératoire

La morphologie des spermatozoïdes était évaluée grâce à la classification du Kruger (WHO, 2010). La classification de Kruger recense une seule anomalie par spermatozoïde. L'anomalie était recensée par ordre d'importance comme suit : acrosome, tête, pièce intermédiaire, flagelle. Aussitôt qu'une anomalie était recensée, le spermatozoïde était directement classé dans les « anormaux ». Les évaluations de la morphologie selon Kruger étant beaucoup plus strictes; on parlait de morphologie normale lorsqu'on avait moins de 15 % de spermatozoïdes anormaux lors de l'évaluation de la morphologie sur frottis coloré. S'il y avait une prédominance d'une anomalie en particulier, il était important de la noter. Les principales anomalies recensées étaient les suivantes:

Anomalies de la tête : Acrosome anormal, absent, vacuolé, Tête allongée, amincie, microcéphale, macrocéphale multiple

Anomalies de la pièce intermédiaire : Reste cytoplasmique (extrusion), Pièce grêle, Pièce angulée

Anomalies du flagelle : Absent, écourté, de calibre irrégulier, Enroulé, Multiple

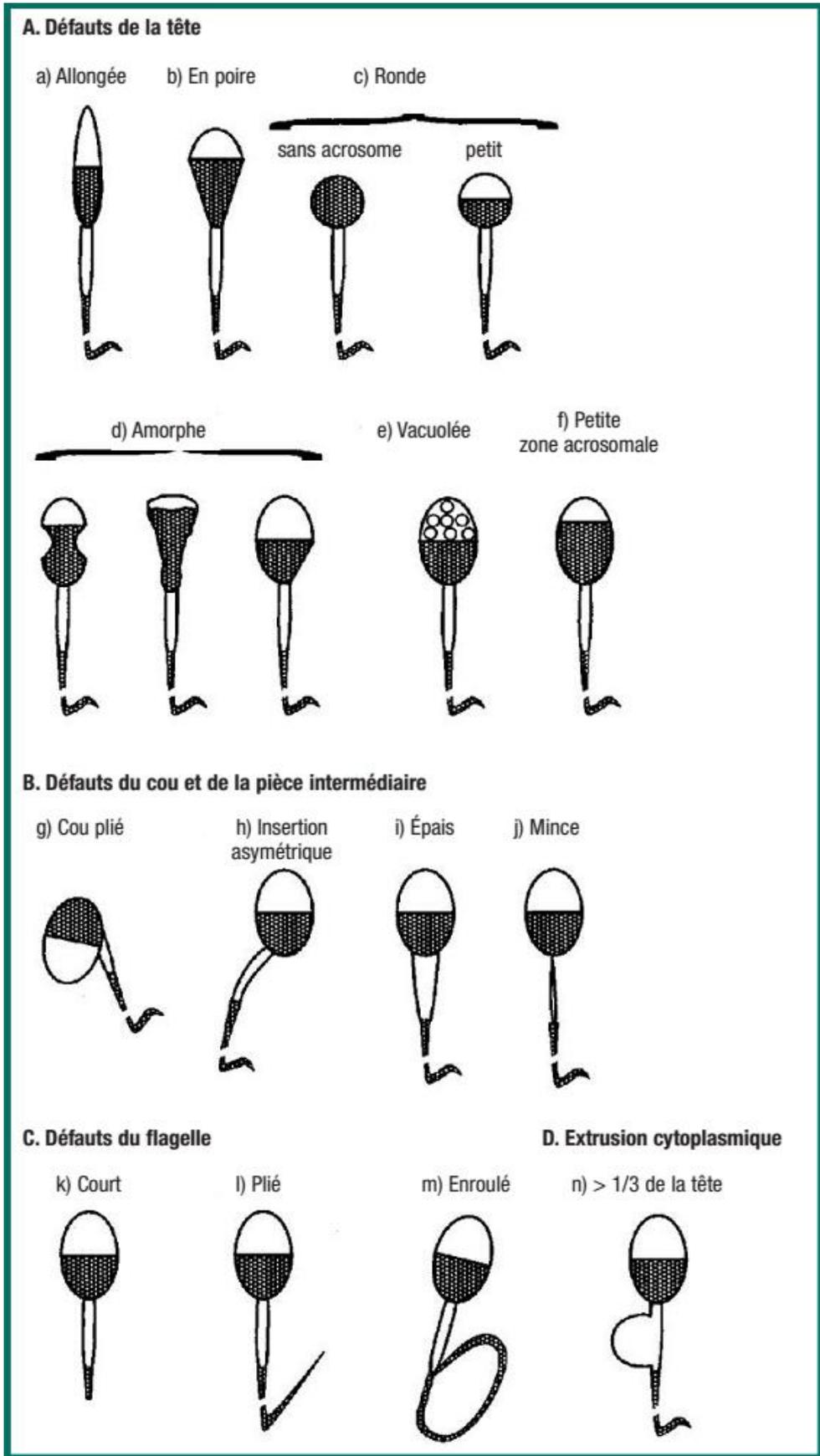


Figure 23: Evaluation de la morphologie des spermatozoïdes. (Dussault, 2009).

▪ **L'interprétation des résultats du spermogramme :**

Elle se fait non seulement sur la base des résultats mais également en considérant plusieurs paramètres d'analyse du sperme (condition de collecte de l'échantillon, imperfection des mesures), mais aussi les fluctuations physiologiques du sperme comme le rythme des éjaculations, la saison, l'âge, la médication, le stress, le tabagisme et l'alcool, pour ne nommer que ceux-là.

Tableau VIII: Seuil de normalité des différents paramètres spermatiques. (WHO, 2010)

Anomalies du nombre	>200 millions/ml 15 à 200 millions/ml <15 millions/ml <5 millions/ml <1 millions/ml	Polyzoospermie Oligozoospermie Oligozoospermie Oligozoospermie Azoospermie Normale Légère Sévère Extrême
Anomalies de la mobilité (en fonction du grade)	≥40% de formes mobiles (a+b+c) ≥32% de mobilité progressive (a+b) (a+b+c)<40% et ou a+b<32%	} Normale Asthénospermie	
Anomalies de la vitalité	≥58 % <58 % Nécrospermie	Normale
Anomalies de la morphologie	≥4 % <4 % Tératozoospermie	Normale
Association d'anomalies		Oligoasthénotératozoospermie (OATS) de degrés divers.	
Anomalies du volume	Absence (0ml) <1,5ml >6,0ml	Aspermie Hypospermie Hyperspermie	

a: progression rapide ; b: progression lente ; c: agitation sans progression

II.2.9 Dosage du fructose dans le plasma séminal (Voir annexe 2)

Le test fructose vise à mesurer la quantité de fructose dans le sperme ou le plasma séminal humain. Le fructose du sperme est le reflet de la fonction sécrétoire des vésicules séminales.

Le test fructose peut contribuer à évaluer le diagnostic et la prise en charge de la stérilité masculine.

✓ Principe

Le fructose et l'indole en présence de chaleur et d'acide chloridrique, forme un complexe coloré qui absorbe entre 470 et 492nm.

Fructose + Indole $\xrightarrow[\text{Acide}]{\text{Chaleur}}$ complexe coloré absorbant les longueurs d'onde de 470-492 nm

✓ Mode opératoire

Tableau IX: Témoins de fructose

Les témoins fructose étaient préparés comme énoncé dans le tableau suivant:

Témoin	Fructose	Eau distillée
5 mg/ml	100 µl	0 µl
2,5 mg/ml	50 µl	50 µl
1 mg/ml	20 µl	80 µl

Tableau X: Mode opératoire pour le dosage du fructose

Réactifs	Blanc	Témoin	Essai
Plasma séminal (µl)	/	100	100
TCA (µl)	500	500	500
➤ Centrifuger 3500tr/min pendant 10 min ➤ Pipeter le surnageant et le conserver			
Surnageant (µl)	/	20	20
HCL (32%) (µl)	200	200	200
<i>Sceller les tubes et les incubent pendant 30 minutes à 37°C au bain-Marie</i>			
NaOH (0,5M) (µl)	200	200	200
<i>Lecture de l'absorbance entre 470-492 nm</i>			

La valeur mesurée (DO) pour l'échantillon était placée sur le graphique pour la comparer à la courbe témoin (en utilisant les 3 témoins mentionnés plus haut), en plaçant la densité optique (DO) sur l'axe des Y et la concentration en fructose sur l'axe des X (voir annexe 4).

Pour obtenir les quantités totales de fructose, nous multiplions le résultat/ml par le volume total de l'échantillon de sperme.

II.2.10 Dosage des hormones (voir annexe 2)

II.2.10.1 Dosage sérique de l’Inhibine B

✓ Principe

L’inhibine B a été déterminée en double à l'aide de la technique ELISA *Inhibin B Gen II* (Beckman Coulter, 2015), qui est un dosage « en sandwich » à trois étapes amplifié de manière enzymatique. Dans le test, les étalons, les contrôles et les échantillons étaient incubés dans des puits de microtitration recouverts d'anticorps anti-activine B (Ludlow *et al.*, 2008). Après incubation et lavage, les puits étaient incubés avec un anticorps de détection de la sous-unité à anti-Inhibine biotinylée. Après une deuxième étape d’incubation et de lavage, les puits étaient incubés dans de la streptavidine marquée avec l'enzyme peroxydase de raifort (HRP). Après une troisième étape d'incubation et de lavage, les puits étaient incubés avec le substrat tétraméthylbenzidine (TMB). Après incubation, une solution d'arrêt acide était ajoutée. Le degré de renouvellement enzymatique du substrat était déterminé par une mesure d'absorbance à deux longueurs d'ondes à 450 nm en tant que filtre d'essai primaire et à 630 nm en tant que filtre de référence primaire. L'absorbance mesurée était directement proportionnelle à la concentration en inhibine B dans les échantillons. Un ensemble de calibrateurs *Inhibin B Gen II* étaient utilisé pour tracer une courbe d’étalonnage de l’absorbance en fonction de la concentration en inhibine. Les concentrations en inhibine B dans les échantillons pouvaient ensuite être calculées à partir de cette courbe d’étalonnage (voir annexe). L'absorbance mesurée était directement proportionnelle à la concentration en inhibine B dans les échantillons.

✓ Mode opératoire

Tableau XI: Protocole de dosage de l’inhibine B

Réactifs	Calibrateurs	Contrôles	Patients
Sérum (µL)	50	50	50
Tampon “ <i>Inhibin B Gen II</i> ”(µl)	50	50	50
– Incuber à température ambiante en les agitant pendant 2h – Aspirer et laver chaque puits 5 fois			
Conjugué anticorps-biotine “ <i>Inhibin B Gen II</i> ” (µl)	100	100	100
– Incuber 60 minutes en agitant – Aspirer et laver chaque puit 5 fois			
Conjugué Streptavidine-enzyme enzymatique “ <i>Inhibin B Gen II</i> ” (µl)	100	100	100
Incuber 30 minutes, aspirer et laver			
Solution chromogène TMB (µl)	100	100	100
– Eviter l’exposition à la lumière directe – Incuber 8à 12 minutes			
Soluton d’arrêt (µl)	100	100	100
Lire l’absorbance dans les 30 minutes à l’aide d’un lecteur de microplaque réglé à 450nm.			

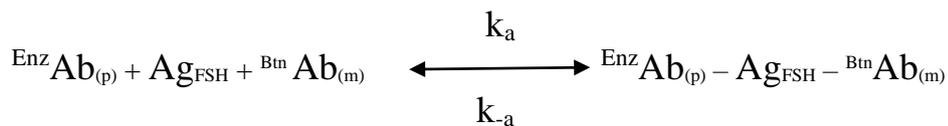
✓ Résultats

Nous avons déterminé la concentration en inhibine B des contrôles et des échantillons à partir de la courbe d'étalonnage en faisant correspondre leurs lectures d'absorbance moyenne aux concentrations correspondantes en inhibine B.

II.2.10.2 Dosage sérique de la *Folliculine Stimulating Hormone* (FSH) (voir annexe 2)

✓ Principe

Les taux sériques de FSH ont été mesurés avec un dosage immunoenzymométrique sur microplaque (ELISA). Dans cette procédure, l'immobilisation a lieu pendant le dosage à la surface d'un puits de microplaque grâce à l'interaction de la streptavidine déposée sur le puits et d'un anticorps monoclonal anti-FSH biotinylé ajouté de manière exogène. Lors du mélange d'anticorps monoclonal biotinylé, l'anticorps marqué par une enzyme et un sérum contenant l'antigène natif et les anticorps sans compétition ni entrave stérique pour former un complexe sandwich soluble. L'interaction est illustrée par l'équation suivante :



$\text{B}^{\text{tn}} \text{Ab}_{(m)}$ = Anticorps monoclonal biotinylé

Ag_{FSH} = Antigène Natif

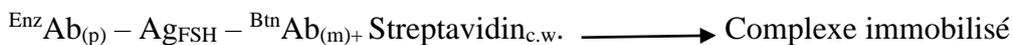
$\text{Enz Ab}_{(p)}$ = Anticorps marqué aux enzymes

$\text{Enz Ab}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{FSH}} - \text{B}^{\text{tn}} \text{Ab}_{(m)}$ = Complexe sandwich antigène-anticorps

k_a = Constante du taux d'association

k_{-a} = Constante de vitesse de dissociation

Simultanément, le complexe est déposé dans le puits par la réaction de haute affinité de la streptavidine et de l'anticorps biotinylé. Cette interaction est illustrée ci-dessous:



$\text{Streptavidin}_{c.w.}$ = Streptavidine immobilisée sur le puit

Complexe immobilisé = complexe sandwich lié à la surface solide

Une fois l'équilibre atteint, la fraction liée à l'anticorps est séparée de l'antigène non lié par décantation ou aspiration. L'activité enzymatique dans la fraction liée à l'anticorps est directement proportionnelle à la concentration en antigène natif. En utilisant plusieurs références sériques différentes de valeurs d'antigène connues, une courbe de réponse à la dose

peut être générée à partir de laquelle la concentration d'antigène d'un inconnu peut être déterminée.

✓ Mode opératoire

Tableau XII: Protocole de dosage de la FSH

Réactifs	Calibrateurs	Contrôles	Patients
Sérum (µl)	50	50	50
Solution FSH-Enzyme (µl)	100	100	100
<ul style="list-style-type: none"> - Agiter gentiment la microplaque afin de mélanger son contenu pendant 20 à 30 secondes puis couvrir <ul style="list-style-type: none"> - Incuber à température ambiante pendant 60 minutes <ul style="list-style-type: none"> - Aspirer et laver chaque puits 3 fois 			
Substrat de travail (µL)	100	100	100
<ul style="list-style-type: none"> - Ne pas agiter ! <ul style="list-style-type: none"> - Incuber à température ambiante pendant 15 minutes 			
Solution d'arrêt (µL)	50	50	50
Mélanger gentiment			
Lire l'absorbance dans les 30 minutes à l'aide d'un lecteur de microplaque réglé à 450nm.			

Nous avons déterminé la concentration en FSH des contrôles et des échantillons à partir de la courbe d'étalonnage en faisant correspondre leurs lectures d'absorbance moyenne aux concentrations correspondantes en FSH.

II.2.11 Dosage des marqueurs du statut oxydatif dans le plasma séminal

Le liquide séminal était obtenu par centrifugation du sperme total à 3000 tours /minute pendant 5 minutes et recueil du surnageant.

II.2.11.1 Dosage des marqueurs antioxydants

II.2.11.1.1 La catalase (EC 1.11.1.6)

✓ Principe

La détermination de l'activité de la catalase a été faite suivant la méthode décrite par Sinha (1972). Le mélange dichromate-acétate transformé en acétate de chrome en présence du peroxyde d'hydrogène et de la chaleur conduit à la formation de l'acide chromique intermédiaire réactionnel instable.

✓ Mode opératoire

Dans chaque tube nous avons introduit 0,9ml de tampon phosphate, 0,1ml de plasma séminal et 0,4ml de H₂O₂ pour déclencher la réaction. La réaction était interrompue après 60 secondes par l'introduction de 2ml d'acide dichromique et le mélange était ensuite porté à ébullition

pendant 10 min. La densité optique de l'acétate de chrome était déterminée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm.

Tableau XIII: Mode opératoire pour la détermination de l'activité de la catalase

Réactifs	Blanc	Essai
Plasma séminal (µl)	/	100
Tampon phosphate (µl)	1400	900
<i>Homogénéisation</i> <i>Ajout de H₂O₂ pour déclencher la réaction</i>		
H ₂ O ₂ (µl)	/	400
- Arrêt de la réaction après 60 secondes par ajout du dichromate-acide acétique		
Dichromate-acide acétique (µl)	2000	2000
<i>Homogénéisation</i> <i>Chauffage dans l'eau bouillante (100°C) pendant 10 minutes</i> <i>Lecture de l'absorbance à 530nm</i>		

$$\bullet \text{ Activité spécifique catalase } \left(\frac{\text{UI}}{\text{mg}} \text{ protéine} \right) = \frac{\text{DO} \cdot \text{fd}}{0.0017 \times \text{Vs} \times \text{C}_{\text{protéines}}}$$

- C_{protéines} = Concentration de protéines dans le sérum (mg/ml)

- Vs = Volume du sérum (ml) = 0,1 ml

- ΔDO = Variation de la densité optique entre 30 secondes et 150 secondes (2 minutes)

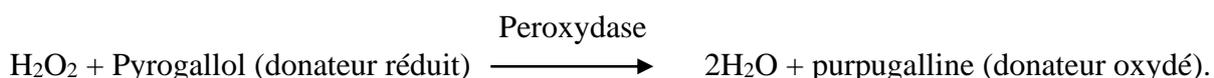
- fd = 1

II.2.11.1.2 Glutathion Peroxydase (EC 1.11.1.9)

✓ Principe

La détermination de l'activité peroxydasique est basée sur la réaction suivante :

En présence d'H₂O₂, le pyrogallol donne un complexe coloré (pyrogalline) qui absorbe à 420nm.



✓ Mode opératoire (CAS Number 7722-84-1, Sigma Aldrich).

Dans chaque tube nous avons introduit 2,1 ml d'eau distillée, 0,32 ml de tampon phosphate à pH 6, 0.1 ml de plasma séminal et 0,32 ml de pyrogallol (0,5%). La réaction était déclenchée

en ajoutant 0,16 ml de peroxyde d'hydrogène (0,5%). Après homogénéisation immédiate, la DO était lue après 20 secondes et après 140 secondes à 420 nm.

Tableau XIV: Protocole de dosage du glutathion peroxydase

Réactifs	Blanc	Essai
Eau distillée (µl)	2100	2100
Tampon phosphate (100mM, pH: 6,1) (µl)	420	320
Solution du peroxyde d'hydrogène (0.5%) (µl)	160	160
Solution de pyrogallol (0,5%) (µl)	320	320
Plasma séminal	-	100

Homogénéisation, immédiatement et lire la DO après 20 sec et après 140 sec
DO 420 nm

Activité spécifique GPx

$$= \frac{(\Delta A_{420} / 20 \text{ sec Test Sample} - \Delta A_{420} / 20 \text{ sec Blank}) (3) (df)}{(12) (0.1)}$$

Cette activité était exprimée en UI/mg de protéines

12 = coefficient d'extinction molaire

3 = volume total

ΔA = Variation de la densité optique entre 20 secondes et 140 secondes (2 minutes)

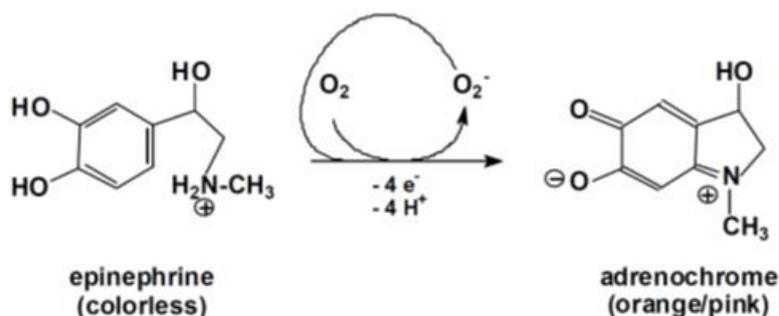
0,1 = volume enzyme

Df= 1

II.2.11.1.3 Superoxyde dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)

✓ **Principe**

La méthode utilisée pour le dosage du superoxyde dismutase est celle de Misra et Fridovich (1972). La SOD inhibe l'auto-oxydation de l'épinéphrine à pH 10,2.



✓ **Mode opératoire**

Nous introduisons successivement dans un tube à essai contenant 0,15ml de plasma séminal, 0,5ml du tampon carbonate-bicarbonate (0,3M) ; 0,25ml EDTA (0,6mM) et 0,35ml d'eau distillée. La réaction a été déclenchée en ajoutant 0,15 ml adrénaline (4,5mM). Les densités optiques ont été lues après 30 secondes et 150 secondes à 480 nm.

Tableau XV: Protocole de dosage de la SOD

Réactifs	Echantillons	
	Blanc	Essaie
Plasma séminal (µl)	-	150
Tampon carbonate-bicarbonate (pH 10,2 ; 0,3 M, Pka 10,3) (µl)	650	500
EDTA (0,6mM) (µl)	250	250
Eau distillée (µl)	350	350
Homogénéisation		
Epinéphrine (4,5 mM) (µl)	250	250
- Homogénéisation - Lecture de l'absorbance à 480 nm		

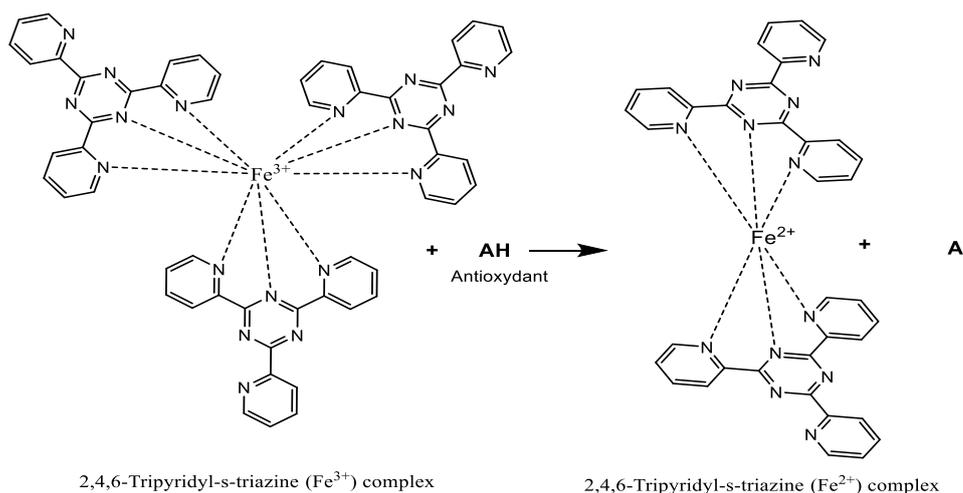
$$\text{Activité spécifique SOD } \left(\frac{\text{UI}}{\text{mg}} \text{ protéines} \right) = \frac{\Delta \text{DO} * 106 * \text{fd}}{4020 * C_{\text{protéines}} * V_s}$$

- $C_{\text{protéines}}$ = Concentration de protéines dans le sérum (mg/ml)
- V_s = Volume du sérum (ml) = 0,15 ml
- ΔDO = Variation de la densité optique entre 30 secondes et 150 secondes (2 minutes)
- $\text{fd} = 1$

II.2.11.1.4 Détermination de la capacité antioxydante totale par la *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP)

✓ **Principe**

Le FRAP a été réalisée suivant la méthode de Benzie et Strain (1996). Cette méthode mesure la capacité des échantillons à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) à pH acide (3,6). L'intensité de la couleur bleue formée par le tripydyltriazine ferreux et mesurée à 593 nm est proportionnelle au pouvoir antioxydant de l'échantillon.



✓ Mode opératoire

Dans chaque tube, nous introduisons successivement 0,075ml de plasma séminal et 1ml de réactif de FRAP. Après homogénéisation et incubation 12min à température ambiante, nous lisons l'absorbance à 593nm.

Tableau XVI: Mode opératoire pour la détermination de la capacité anti-oxydante totale

Réactifs	Blanc	Essai
Plasma séminal (µl)	-	75
Eau distillée (µl)	75	-
Réactif de FRAP (µl)	1000	1000

- Homogénéisation et incubation pendant 12 min, température ambiante

- Lecture de l'absorbance à 593 nm

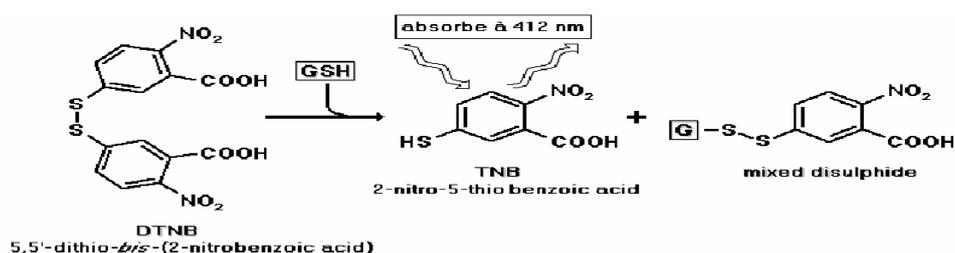
Après avoir tracé la courbe d'étalonnage $D_0 = f [Fe_2SO_4]$, nous déterminons la concentration des échantillons en utilisant une équation de régression obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (voir annexe).

II.2.11.1.5 Dosage du glutathion réduit

✓ Principe

La méthode utilisée pour le dosage du glutathion réduit est celle d'Ellman (1959).

L'acide 2,2-dithio-5,5'-dibenzoïque (DTNB) réagit avec les groupements SH du glutathion pour former un complexe coloré qui absorbe à 412 nm.



✓ **Mode opératoire**

Nous introduisons dans chaque tube à essai 0,02 ml de plasma séminal et de 3 ml de réactif d'Ellman. Après agitation au vortex, nous laissons se développer la coloration pendant 60 min à température ambiante. Dans le tube contrôle, nous mettons 0,02 ml de tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) et 3ml de réactif d'Ellman. La densité optique était lue à la longueur d'onde de 412 nm contre le contrôle. Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol/l}$.

Tableau XVII: Mode opératoire pour la détermination du glutathion réduit

Réactifs	Blanc	Essai
Réactif d'Ellman (μl)	3000	3000
Plasma séminal (μl)	-	20
Tampon phosphate 0,1M (ml) pH : 6,1	20	-

- Homogénéisation
- Lecture de l'absorbance à 412 nm contre le blanc

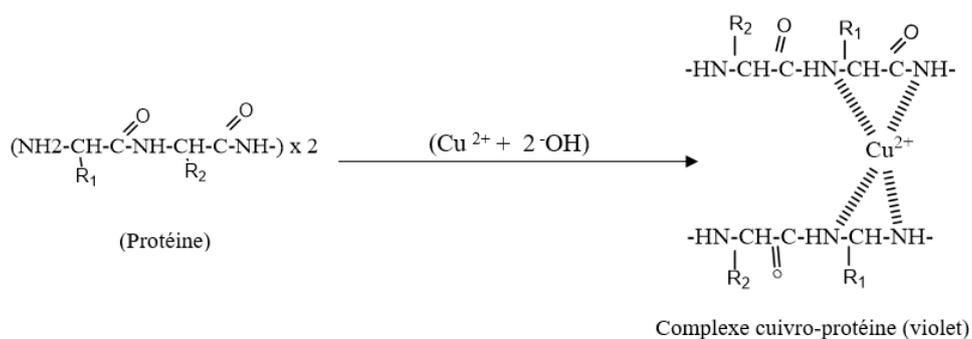
$$[\text{Glutathion}](\mu\text{M}) = \frac{DO * 10^6}{\epsilon_{\text{glutathion}} * l} * fd$$

DO = Densité optique; $\epsilon_{\text{glutathion}} = 13\ 600\ \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; l= trajet optique =1cm; Fd = 1

II.2.11.1.6 Dosage des protéines totales (Gornall et al., 1949)

✓ **Principe**

En milieu basique, le tartrate double de sodium et de potassium forme avec les ions cuivriques un complexe soluble. L'addition d'une protéine déplace le cuivre complexé avec le tartrate pour former un autre complexe cuivro-protéique de couleur violette qui présente un maximum d'absorption à la longueur d'onde de 540 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des protéines dans le milieu.



✓ **Mode opératoire**

Dans chaque tube nous introduisons successivement 0,02ml de plasma séminal (ou d'étalon) et 1ml de réactif de Biuret. Après homogénéisation et incubation 30min à température ambiante, la densité optique était lue à 546nm.

Tableau XVIII: Mode opératoire

Réactifs	Echantillons	
	Etalon	Patients
Plasma séminal (µl)	-	20
Etalon protéine 80 g/L (µl)	20	-
Réactif de Biuret (µl)	1000	1000
- Homogénéisation et incubation 30 min à température ambiante - Lecture de l'absorbance à 546 nm		

Les concentrations des échantillons ont été déterminées par la formule ci-dessous :

$$C = \left[\frac{\text{DO de l'échantillon}}{\text{DO du standard}} \right] \times n$$

- C = Concentration en protéine (g/L)
- n= concentration du standard (80)

II.2.11.1.7 Dosage de la vitamine E

✓ **Principe**

La Vitamine E a été dosée par la méthode de Desai en 1984. En bref, la vitamine E a été extraite du plasma par addition de 1.6ml d'éthanol et 2.0ml d'éther de pétrole à 5.0ml de plasma et centrifugé. Le surnageant a été séparé et évaporé. Au résidu, 0,2ml de 2% de -- dipyridyle, 0,2ml de chlorure ferrique à 0,5% ont été ajoutés et maintenus dans l'obscurité pendant 5 min. Une couche de couleur rouge intense obtenue par l'addition de 4 ml de butanol a été lue à 520 nm.

✓ **Mode opératoire**

Tableau XIX: Mode opératoire pour le dosage de la vitamine E

Réactifs	Blanc	Essai
Plasma séminal (µl)	-	500
Ethanol (µl)	1600	1600
Ether de pétrole (µl)	2000	2000
<i>Centrifuger 2000 trs/min pendant 5 min Séparer le surnageant, puis l'évaporer et garder le résidu</i>		
Ajouter au résidu : α-α-dipyridyl ; 2% (µl)	200	200
Chlorure ferrique; 0,5% (µl)	200	200
<i>Incuber pendant 5 min, température ambiante obscurité</i>		
Butanol (µl)	4000	4000
<i>Lecture de l'absorbance à 520 nm</i>		

La vitamine E est préparée dans une solution de méthanol tel que présenté dans le tableau suivant :

Tableau XX: Etalonnage Vitamine E

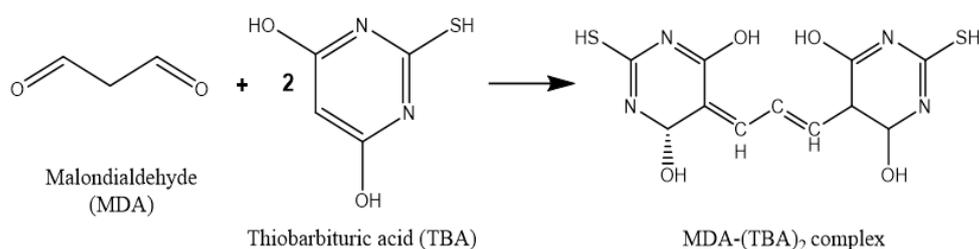
<i>Vit E 200µg/ml</i>	<i>0</i>	<i>2,5</i>	<i>7,5</i>	<i>15</i>	<i>25</i>	<i>50</i>	<i>100</i>
Volume Vit E 200µg/ml (µl)	0	18.75	37,5	75	125	250	500
MeOH ou Ether de pétrole (µl)	1000	981,25	961,5	925	875	750	500
Volume final (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

II.2.11.2 Les marqueurs pro-oxydants

II.2.11.2.1 Dosage du Malondialdéhyde (MDA)

✓ Principe

La méthode utilisée pour le dosage du MDA est celle de Wilbur et *al.* (1949). Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde issu de la décomposition des hydroperoxydes d'acides gras réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose dont la concentration est déterminée par la lecture de l'absorbance à 532 nm.



✓ Mode opératoire

Dans chaque tube à essai nous pipetions 0,1ml de plasma séminal, 2 ml de réactif (mélange TCA-TBA-HCL) et fermions l'ensemble hermétiquement. Par la suite, le mélange était chauffé au Bain Marie à 100°C pendant 15 minutes, puis refroidit dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts. Le mélange était centrifugé à 3000 tours/minutes pendant 5 minutes et l'absorbance du surnageant a été lue à 532nm. Les résultats ont été exprimés en µmol/l.

Tableau XXI: Mode opératoire pour la détermination du MDA

Réactifs	Blanc	Essai
Plasma séminal (µl)	-	100
Eau distillée (µl)	100	-
Solution TCA-TBA-HCL (µl)	2000	2000
<ul style="list-style-type: none"> - Homogénéisation et chauffer, 100°C pendant 15 min - Refroidir, centrifuger, 3000 trs/min pendant 5 min - Lecture de l'absorbance à 532 nm 		

$$[MDA](\mu M) = \frac{DO * 10^6}{\epsilon_{MDA} * l} * fd$$

DO = Densité optique; $\epsilon_{MDA} = 15\ 600\ M^{-1}.cm^{-1}$; l= trajet optique =1cm; Fd = 1

II.2.11.2.2 Dosage du nitrite (NO₂)

✓ Principe :

Le réactif de Griess réagit avec l'ion nitrite (NO₂⁻) présent dans le plasma pour former un colorant rouge. L'ion nitrite forme avec l'acide sulfanilique un sel de diazonium. Ce sel est révélé à 540 nm par une coloration rouge après ajout d'alphannaphthylamine.

✓ Mode opératoire

Tableau XXII: Protocole de dosage du Nitrite.

Réactifs	Blanc	Essai
Plasma séminal (µl)	-	150
Eau distillée (µl)	150	-
Reactif de Greiss (µl)	50	50
Eau distillée (µl)	1300	1300
<ul style="list-style-type: none"> - Homogénéisation et incubation pendant 30 min, température ambiante - Lecture de l'absorbance à 550 nm 		

Tableau XXIII: Etalonnage Nitrite

Tube	0	1	2	2	3	4
[µM] NaNO ₂	0	6,25	12,5	25	50	100
V(µl) NaNO ₂ (100µM)	0	9,5	19	38	75	150
V (µl) H ₂ O	150	149,5	131	112	75	0
Volume final	150	150	150	150	150	150

Après avoir tracé la courbe d'étalonnage $Do = f[NaNO_2]$, nous déterminons la concentration des échantillons en utilisant une équation de régression obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage.

II.2.11.2.3 Détermination du peroxy-nitrite

✓ Principe

Le taux de peroxy-nitrite sérique a été déterminé selon la méthode décrite par Beckman et *al.* cité par VanUffelen et *al.* (1998). La nitration du phénol à médiation par un peroxy-nitrite, entraînant la formation de nitro-phénol, constitue la base du test au peroxy-nitrite.

✓ Mode opératoire

Nous pipetions successivement 0,01ml de plasma séminal, et 1,99ml de réactif Phénol. Après homogénéisation du mélange, nous l'incubons pendant 2h à température ambiante. Passé les 2h, nous ajoutons au mélange 0,15ml de NaOH 0,1M. Enfin, la lecture de la densité optique était lue à 412nm.

Tableau XXIV : Protocole de dosage du peroxy-nitrite

Réactifs	Blanc	Essai
Plasma séminal (µl)	-	10
Eau distillée (µl)	10	-
Reactif Phenol (5mM phenol dans phosphate 50 mM (µl)	1990	1990
<i>- Homogénéisation et incubation pendant 2h, température ambiante</i>		
NaOH (0.1 M) (µL)	15	15
<i>- Lecture de l'absorbance à 412 nm</i>		

La concentration du peroxy-nitrite a été déterminée en utilisant son coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon = 4400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol/l}$.

II.2.11.2.4 Peroxydes plasmatiques totaux (PPT)

✓ Principe

Les concentrations totales de peroxydes ont été déterminées en utilisant la méthode FOX1 (Ferric-xylénol orange) (Galli, 2005). Le système d'essai FOX1 est basé sur l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique par les divers types de peroxydes contenus dans les échantillons de plasma en présence de xylénol orange, ce qui produit un complexe coloré ferrique-xylénol orange dont l'absorbance peut être mesurée à 560 nm.

✓ Mode opératoire

Dans chaque tube à essai, nous pipetions successivement 0,2ml de plasma séminal et 2ml de réactif de FOX1. Après homogénéisation et incubation à température ambiante pendant 30min, le mélange était centrifugé à 2500 trs/mn pendant 10 min puis la densité optique du surnageant lue à 560nm.

Tableau XXV: Protocole de dosage des peroxydes totaux

Réactifs	Blanc	Essai
Plasma séminal (µl)	-	200
Eau distillée (µl)	200	-
Réactif de FOX1 (µl)	2000	2000
- Homogénéisation et incubation pendant 30 min, température ambiante - Centrifuger 2500 trs/mn pendant 10 min - Lecture l'absorbance du surnageant à 560 nm		

Expression des résultats : Tracer la courbe d'étalonnage $Do = f [H_2O_2]$.

Déterminer la concentration des échantillons en utilisant une équation de régression obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage (annexe 3).

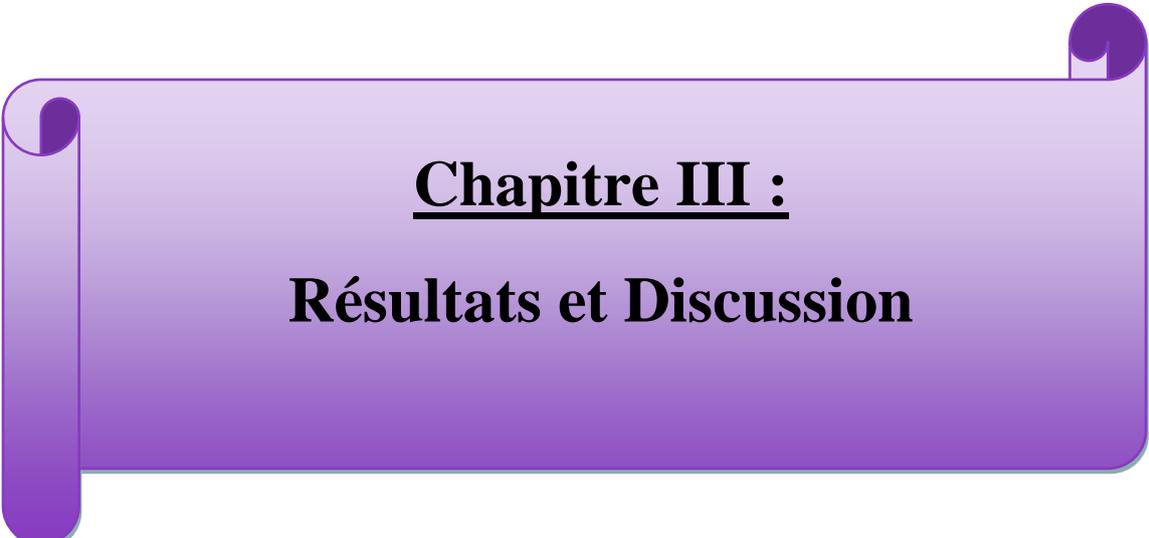
$$\text{Péroxides totaux } (\mu\text{M}) = \frac{DO * fd}{0.0008}$$

II.2.12 Analyses statistique

Les données ont été codées et saisies dans Excel 2016, puis analysées à l'aide du logiciel XLSTAT 2020. Nous avons utilisé la statistique descriptive pour estimer les proportions des différentes variables au sein de la population. Les résultats ont été présentés sous forme d'histogramme, de camembert, tableaux, et diagrammes. Aussi, nous avons appliqué la régression linéaire pour modéliser la relation entre les variables et la régression logistique pour calculer la Odds ratio (OR) qui est un facteur qui permet de quantifier la force de l'association entre deux variables. Les paramètres dont les valeurs étaient très dispersées autour de la moyenne ont été exprimés comme médiane (1^{er} - 3^{ème} quartile) et le test Mann-Whitney U a été utilisé pour comparer les moyennes des Cas aux témoins. La relation entre les paramètres de sperme et les autres facteurs ont été analysées à l'aide du test de corrélation de Spearman et Kruskal-Wallis. Une valeur p de 0,05 a été utilisée pour caractériser des résultats significatifs.

II.2.13 Considérations Ethiques

Une clairance éthique a été obtenue auprès du Comité National d'Éthique de la Recherche en Santé Humaine du Cameroun (CNERSH) sous le numéro: 2015/04/572/CE/CNERSH/SP. Nous avons également obtenu les autorisations des hôpitaux (Annexe 1). Chaque participant avait signé un formulaire de consentement éclairé après lecture de la notice d'information (Annexe 1). Nous avons respecté l'anonymat des patients tout au long de l'étude. Le questionnaire portait pour chaque participant un code ne permettant son identification que par l'investigateur principal. L'avantage pour chaque participant était la gratuité du bilan.



Chapitre III :
Résultats et Discussion

III. Résultats

III.1 Déterminants de l'infertilité masculine

III.1.1 Caractéristiques générales de l'échantillon d'enquête

Au total 240 hommes ont été enquêtés parmi lesquels 179 ont effectivement répondu aux questions et 148 ont fournis les échantillons de sang et de sperme.

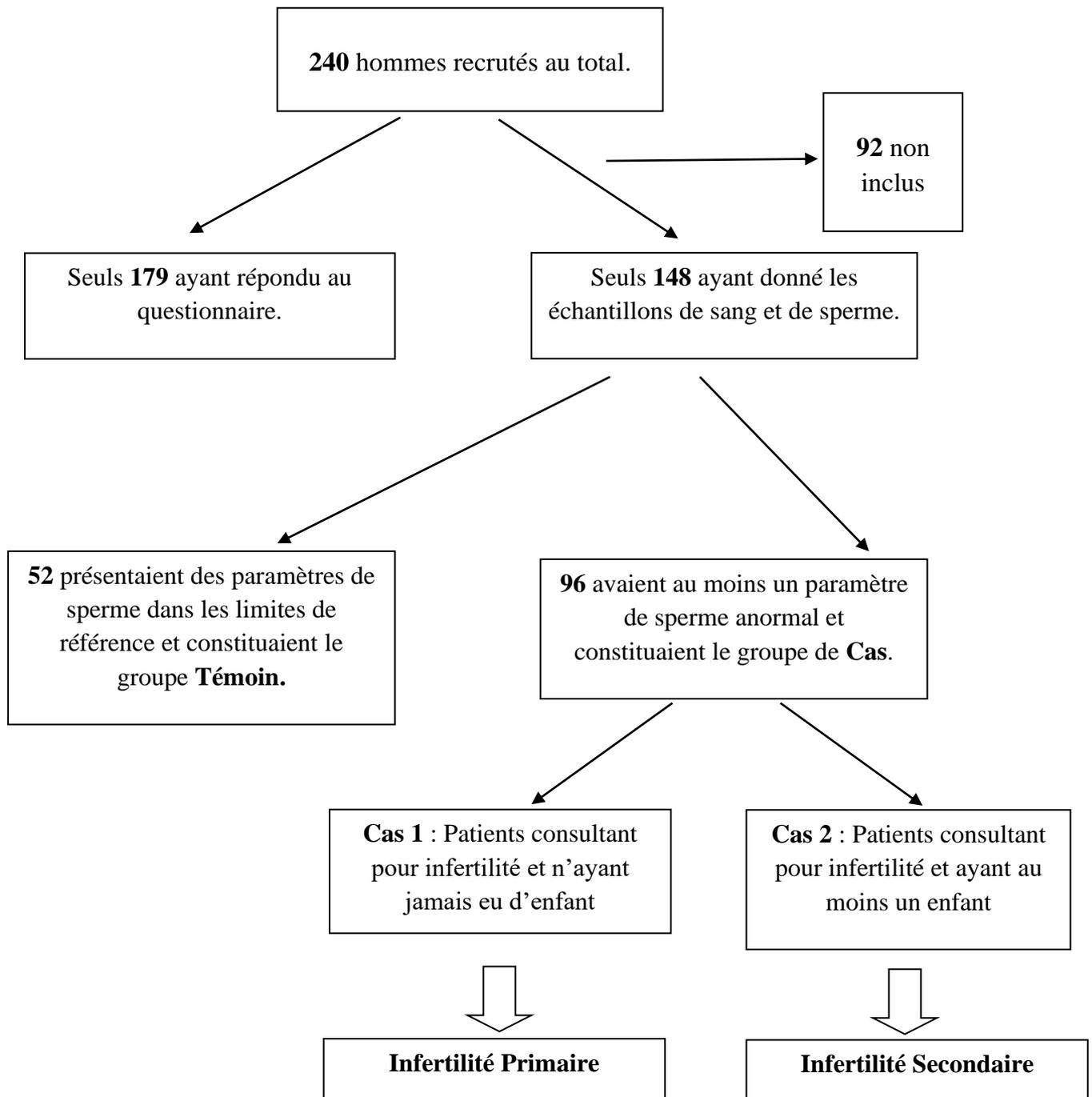


Figure 24 : Répartition de l'échantillon d'enquête

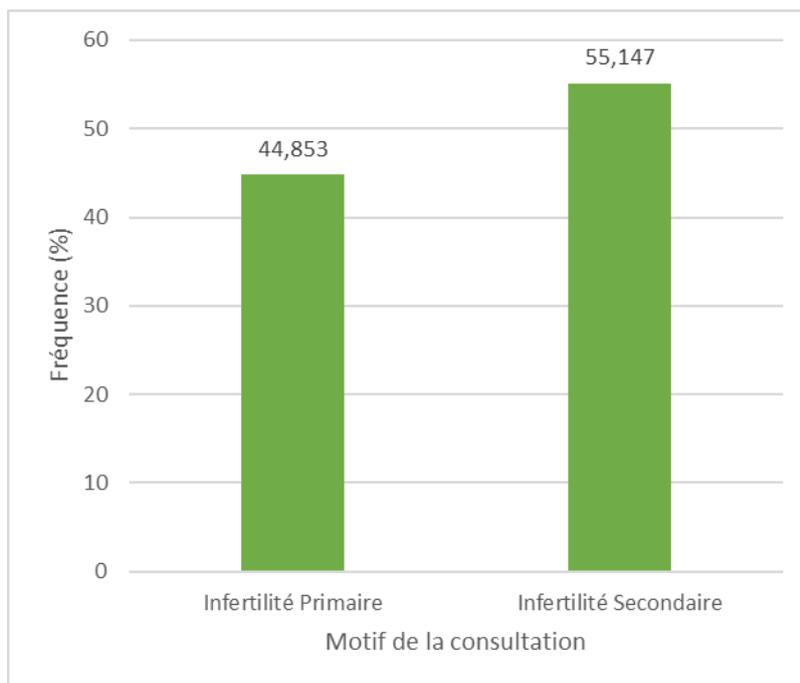


Figure 25: Distribution des patients selon le motif de la consultation

La figure 25 ci-dessus permet d’observer que l’infertilité secondaire était le motif de consultation le plus prépondérant (55%) dans notre population.

Les résultats rapportés dans la figure 26 indiquent que les Cas 2 (infertilité secondaire) avaient en moyenne une durée d’infertilité supérieure à celle des Cas 1 (infertilité primaire). Toutefois, la figure 27 montre que la majorité des Cas 1 tout comme les Cas 2 avaient observé au moins 12 mois d’infertilité.

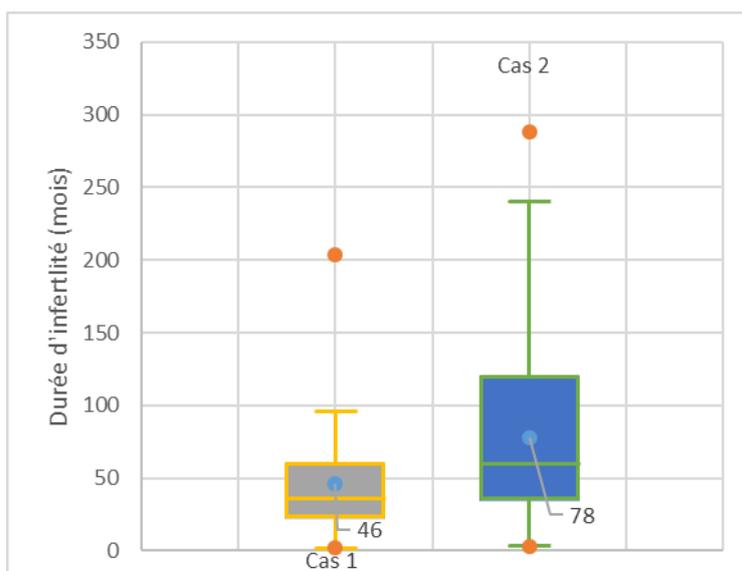


Figure 26: Répartition des patients selon la durée de l’infertilité

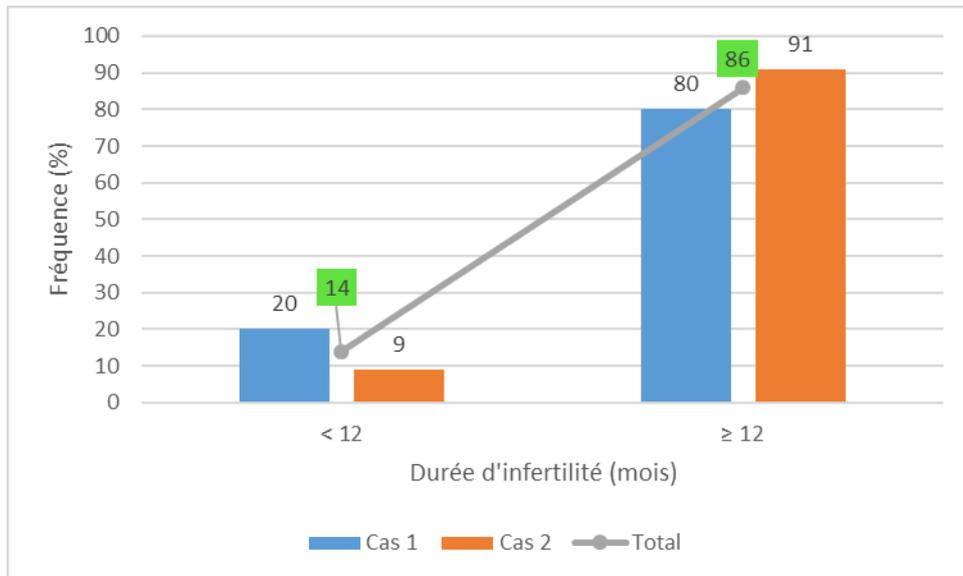


Figure 27: Répartition des patients selon la durée de l'infertilité

III.1.2 Répartition des patients selon l'âge

L'âge moyen de la population globale était de $37,1 \pm 7,37$ ans. La répartition des patients selon l'âge et le groupe de patients rapportée dans la figure 28 indique que les patients consultants pour infertilité primaire (Cas 1) étaient plus jeunes ($33,72 \pm 5,54$ ans), suivi des témoins ($36,90 \pm 8,5$ ans) et du groupe de Cas 2 ($39,96 \pm 6,88$ ans). De plus, la figure 29 nous permet d'observer que la tranche d'âge allant de 30 à 45 ans était majoritaire tant dans le groupe témoins que dans de celui des Cas 1 et 2.

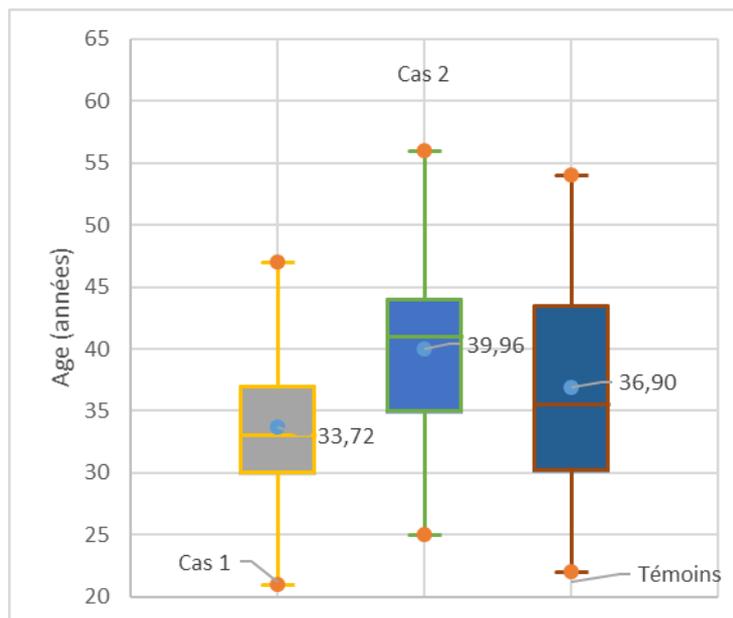


Figure 28: Distribution de la population d'étude en fonction de leur âge.

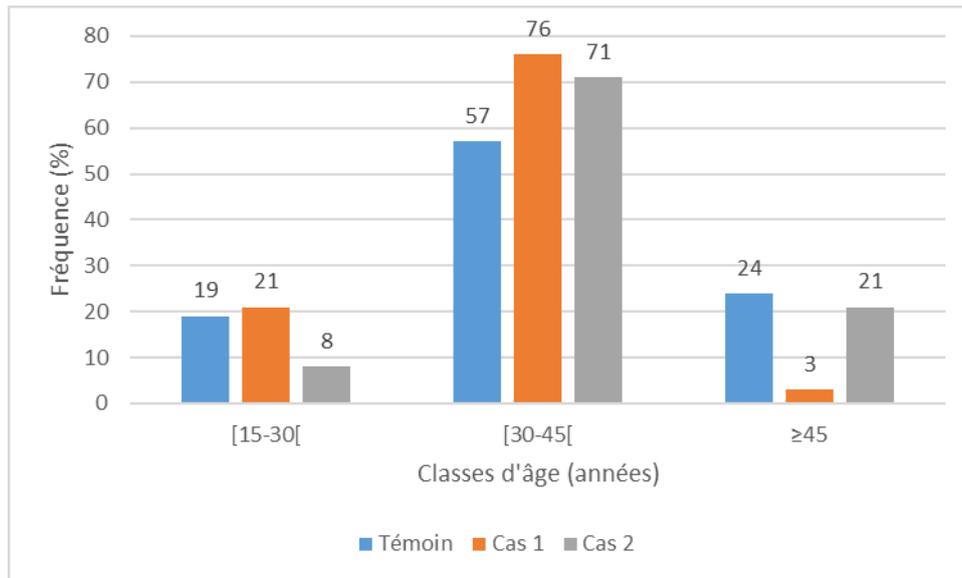


Figure 29: Distribution de la population d'étude en fonction des classes d'âge.

III.1.3 Répartition des patients selon l'indice de masse corporelle (IMC)

L'indice de masse corporelle moyen des participants était de $25,26 \pm 6,8 \text{ kg/m}^2$. Les résultats d'IMC calculés des patients rapportés à la figure 30 indiquent que 63% de la population globale avaient un $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (Figure 30). Selon le groupe étudié, les moyennes d'IMC étaient successivement de $26 \pm 3,13$ chez les Cas 1, $26,24 \pm 3,6$ pour les témoins et de $27,27 \pm 4$ chez les Cas 2 (Figure 31).

La répartition des patients selon les classes d'IMC rapportée dans la figure 32 indique que les patients consultant pour infertilité secondaire (Cas 2) présentaient des fréquences plus élevées de patients en surpoids et obèses. Environ 40% de la population globale (Témoins, Cas 1 et 2) étaient en surpoids ; toutefois, nous n'avons observé des patients en obésité de type II que dans le groupe de Cas (1 et 2).

La régression linéaire de l'IMC en fonction de l'âge (Figure 33) permet de constater que l'IMC augmente significativement avec l'âge ($p=0,001$) tant dans les groupes de Cas que dans celui des Témoins.

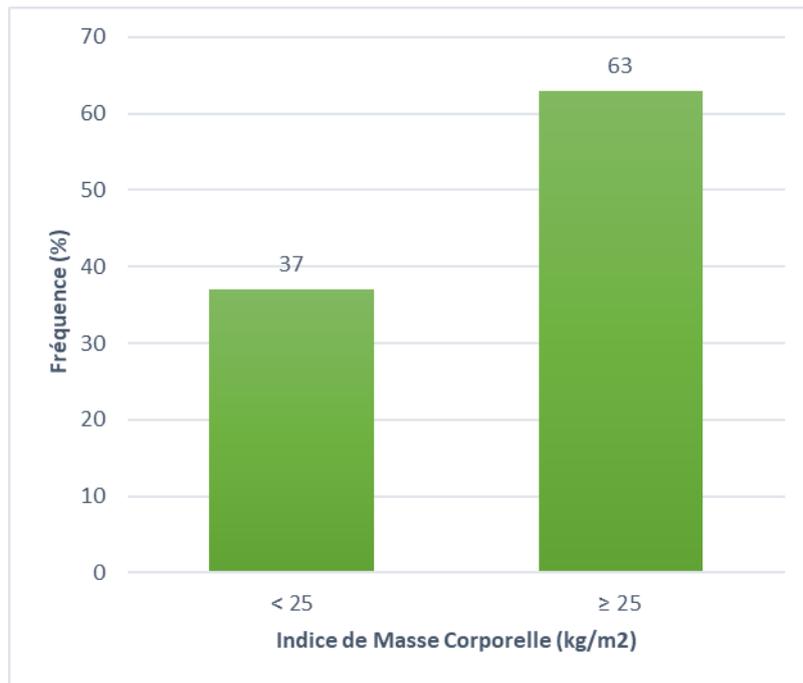


Figure 30: Fréquence du surpoids dans la population générale

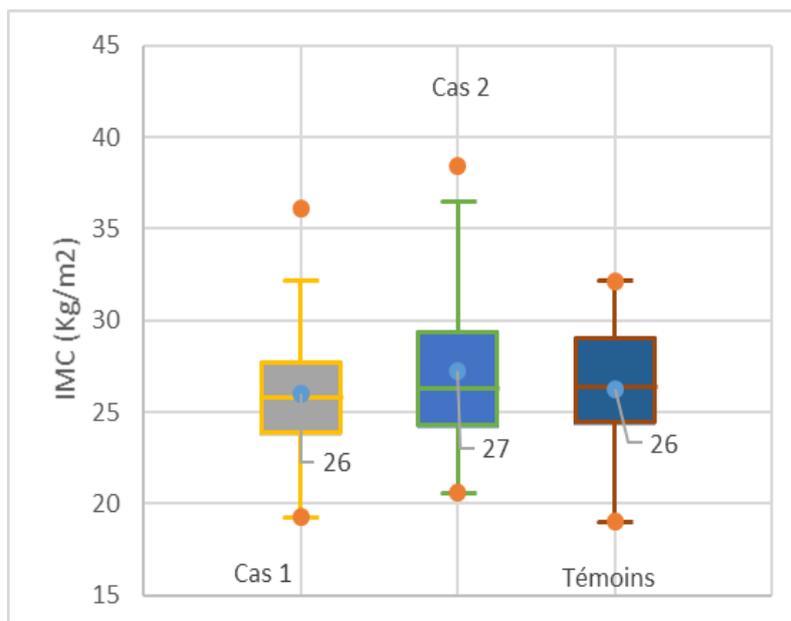


Figure 31: Distribution de la population en fonction de l'IMC

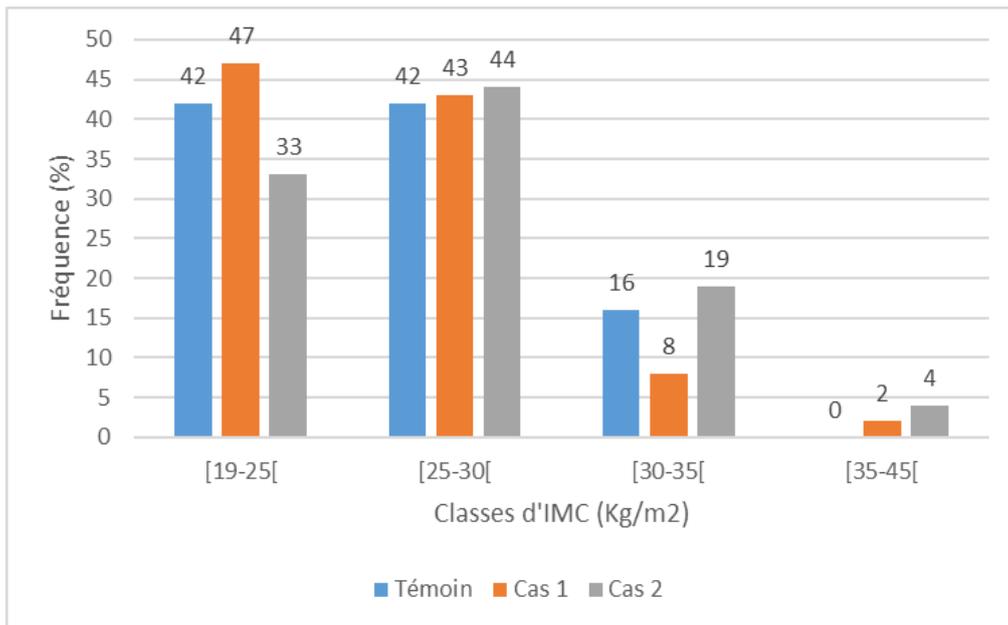


Figure 32: Distribution des patients selon les différentes classes d'IMC

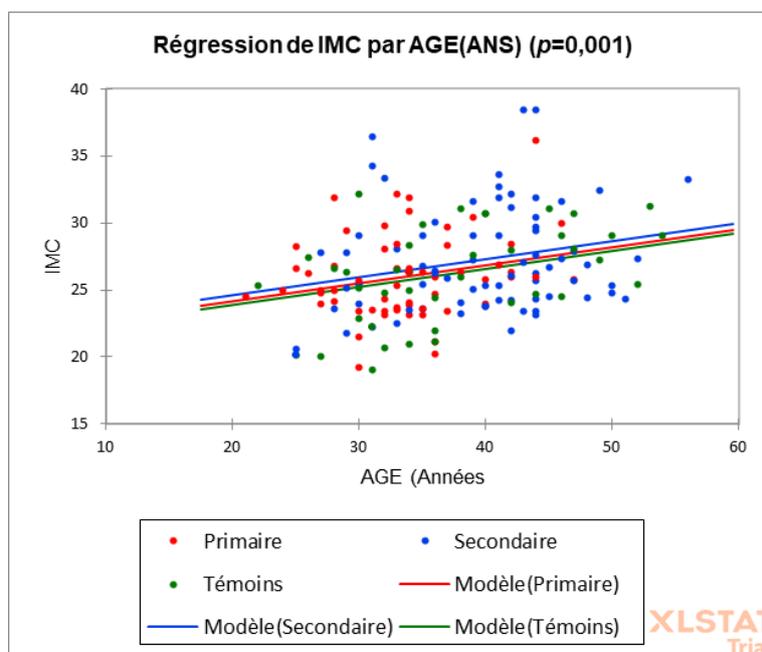


Figure 33: Régression linéaire de l'IMC en fonction de l'âge

III.1.4 Répartition des patients selon le statut marital

Au moment de l'étude, la situation maritale majoritaire était celle de marié (Figure 34). Cependant, les données font ressortir que la proportion d'hommes mariés est de 72% chez Cas 2 mais seulement de 52% tant dans le groupe témoin que dans le groupe de Cas 1.

La figure 35 montre que la classe d'âge majoritaire (30 à 45 ans) était en majorité constituée d'hommes mariés.

La distribution du statut marital en fonction de l'IMC montre que les proportions de patients en surpoids (44%) et obèses (22%) sont plus élevées chez les hommes mariés (Figure 36).

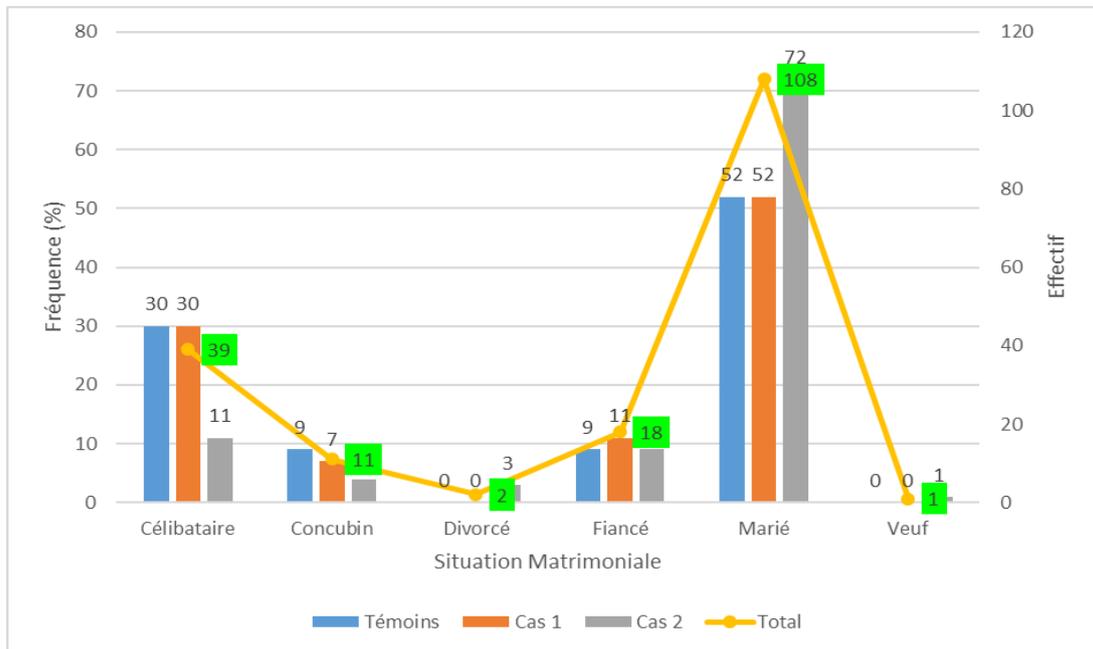


Figure 34: Distribution de la population en fonction du statut marital

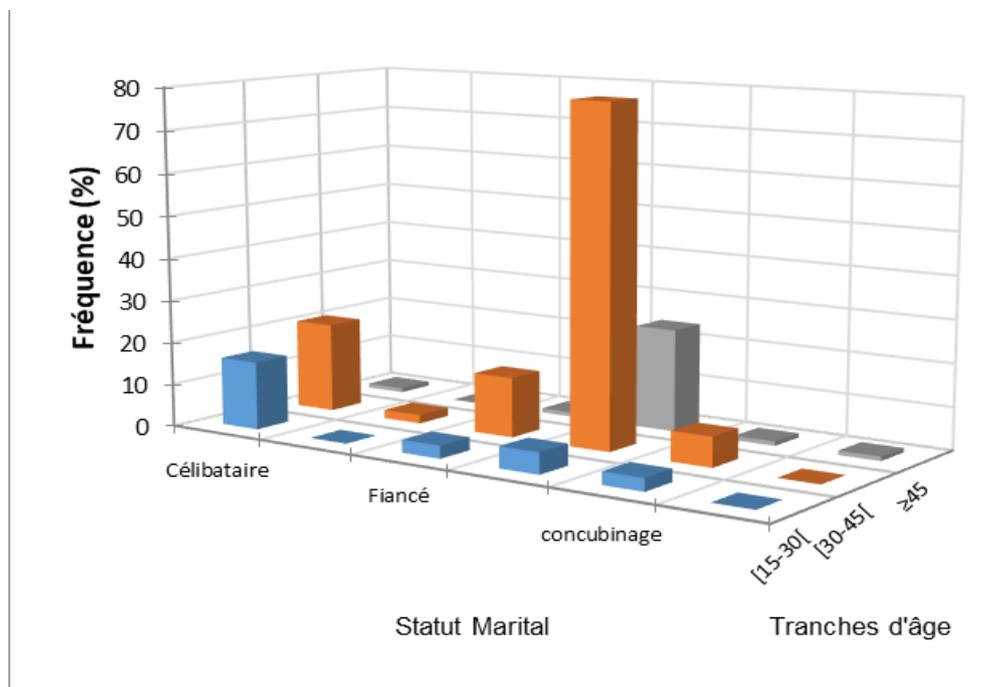


Figure 35: Distribution du statut Marital selon l'âge.

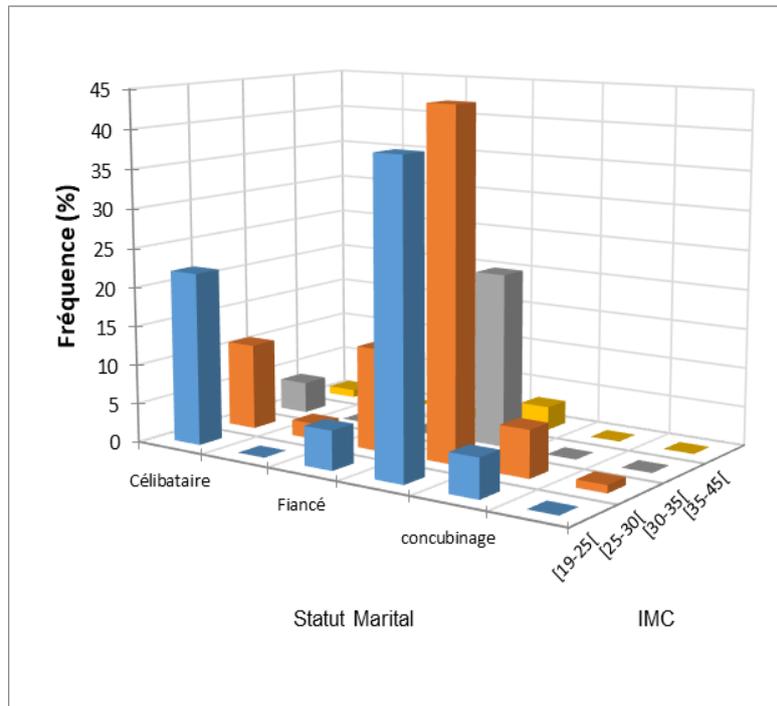


Figure 36: Distribution du statut marital selon l'IMC.

III.1.5 Répartition de la population selon les régions d'origine et de résidence

La répartition des patients selon la région d'origine (Figure 37) montre que les cas (1 et 2) de même que les témoins étaient en majorité originaires du Centre et de l'Ouest. De plus la figure 38 montre que la majorité des patients résidaient au Centre.

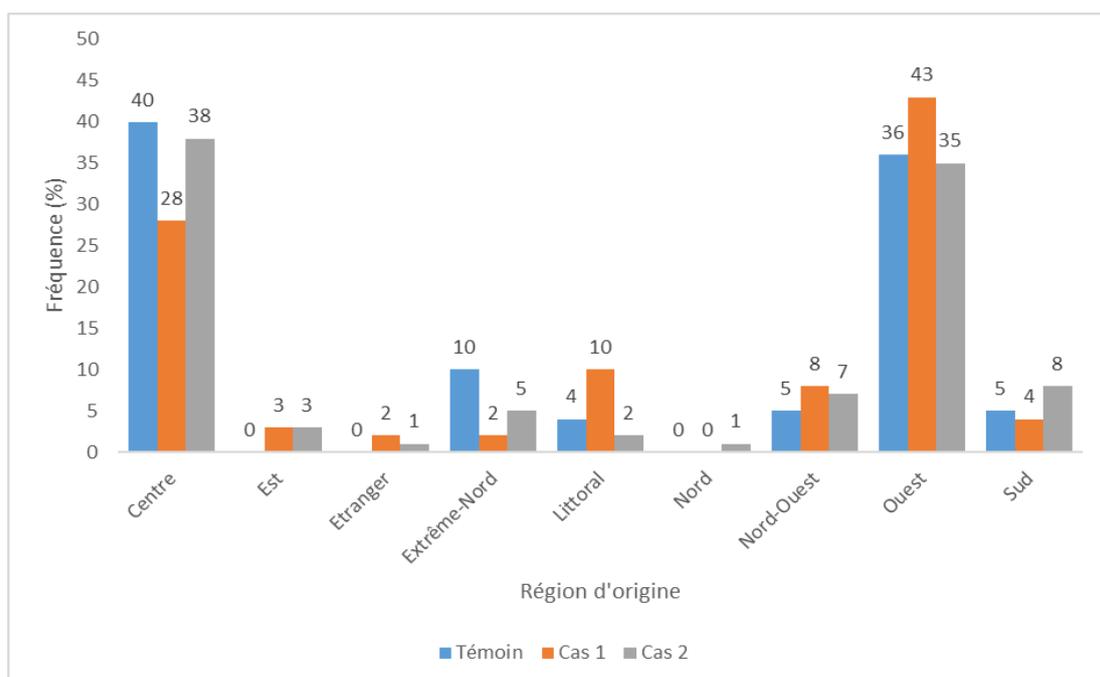


Figure 37: Distribution des patients selon la région d'origine

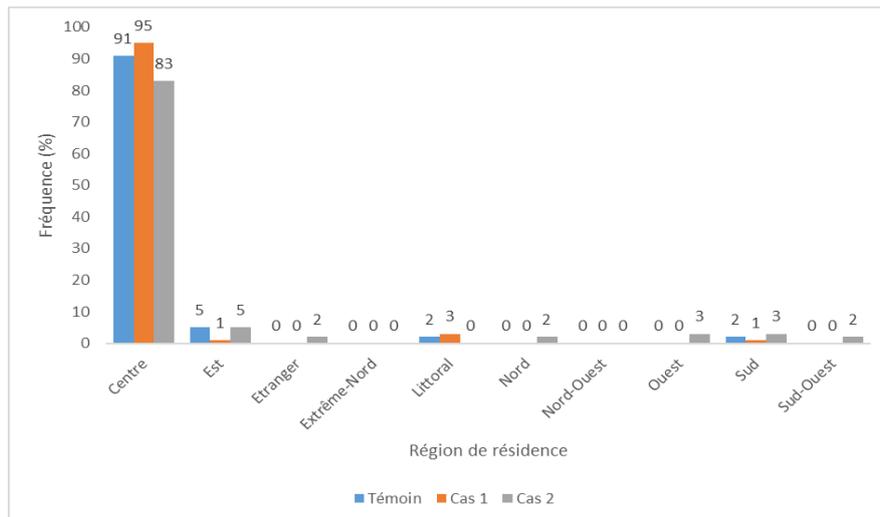


Figure 38: Distribution des patients selon la région de résidence

III.1.6 Répartitions des patients selon la situation professionnelle

La distribution des patients en fonction de l'activité professionnelle (Figure 39) nous permet d'observer que la profession dominante était celle de fonctionnaire de l'État (12%) suivi par les fonctions de chauffeur (8%), commerçant (8%), enseignants (8%). Cependant, les fonctionnaires et chauffeurs appartenaient en majorité au groupe de Cas 2, tandis que commerçants et enseignants appartenaient en majorité au groupe de Cas 1 (Figure 40).

La fréquence du surpoids et de l'obésité selon l'activité professionnelle rapportée en figure 41, indique que les commerçants, les chauffeurs et les informaticiens semblent être les plus en surpoids. Quant à l'obésité, les fonctionnaires avaient les fréquences les plus élevées d'obésité de type I et II.

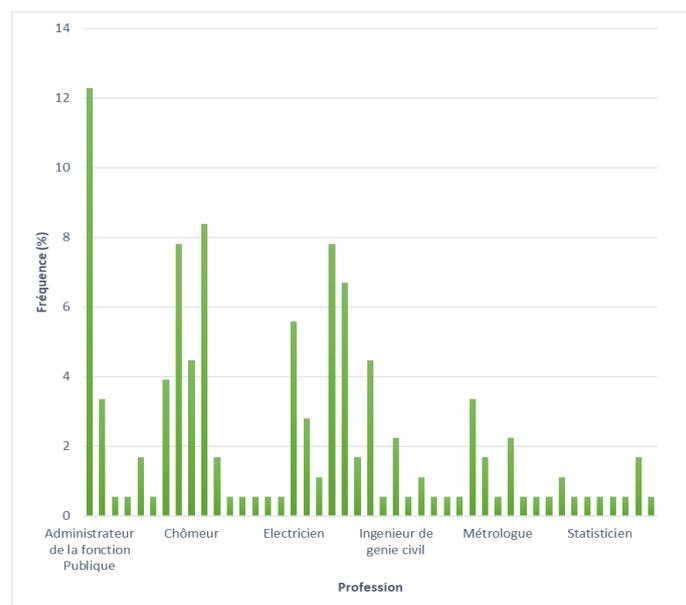


Figure 39: Distribution de la population globale en fonction de la profession

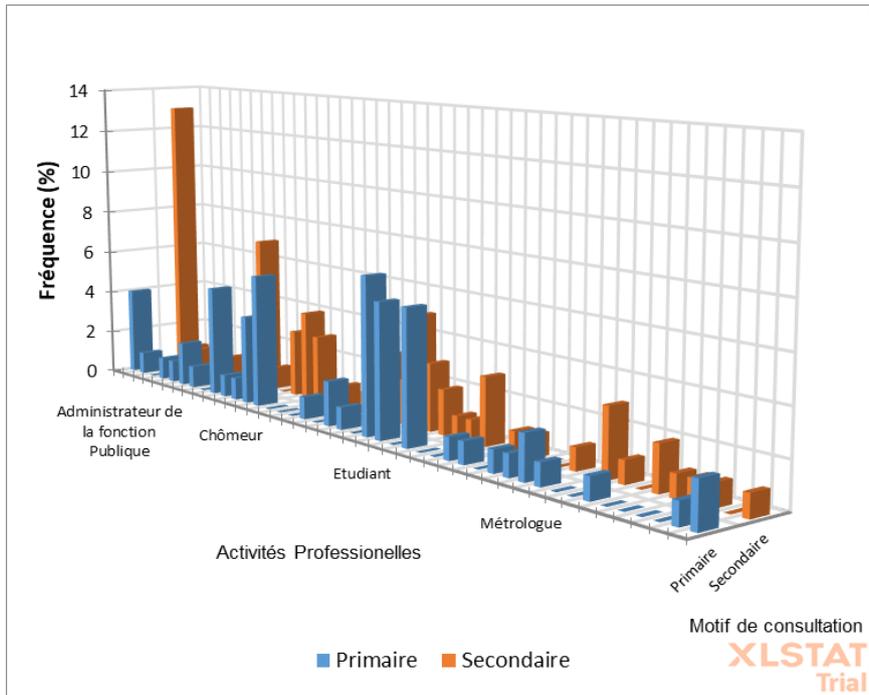


Figure 40: Distribution des Cas selon l'activité professionnelle

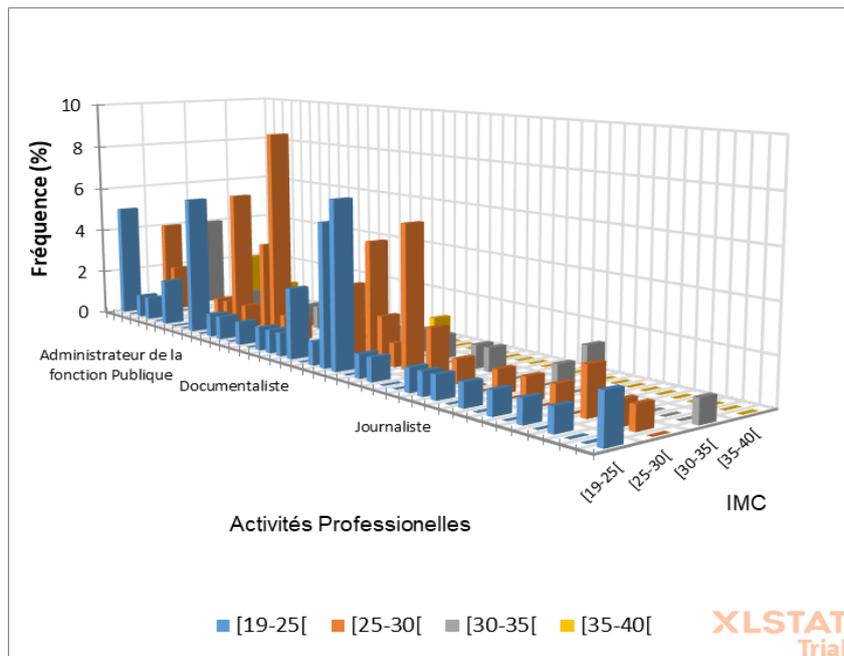


Figure 41: Fréquence du surpoids selon l'activité professionnelle

III.1.7 Fertilité personnelle des CAS

Dans notre population, le nombre d'enfants allait de 0 à 5 avec une médiane de 1 enfant. (Figure 42).

La répartition des Cas selon les antécédents de Procréation Médicalement Assistée (PMA) présentée dans la figure 43, indique que plus de 85% des cas n'avaient jamais eu recours à une PMA.

Quant au nombre de relations antérieures, nous observons (Figure 44) que plus de la moitié des individus avaient 1 à 5 relations antérieures. Egalement, la proportion des Cas 2 ayant eu 5 à 10 relations précédentes était nettement supérieure à celle des Cas 1.

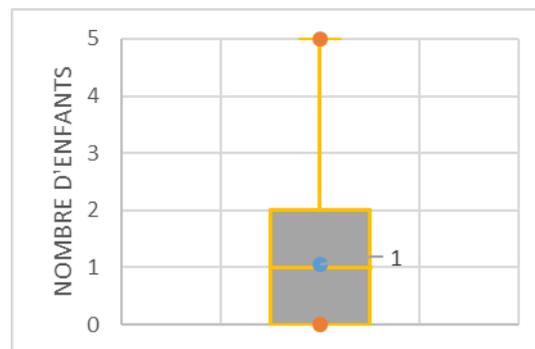


Figure 42: Répartition des Cas selon le nombre d'enfants

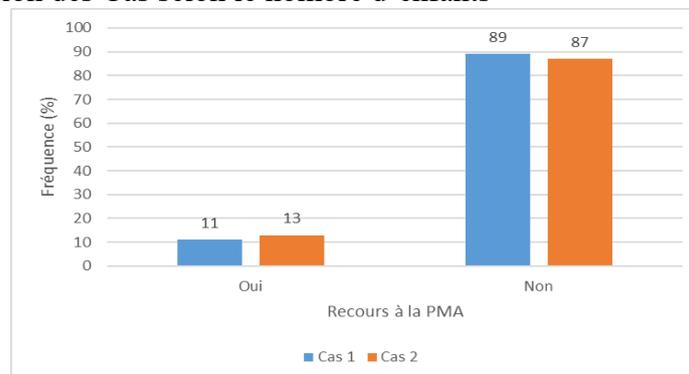


Figure 43: Répartition des Cas selon des antécédents de PMA

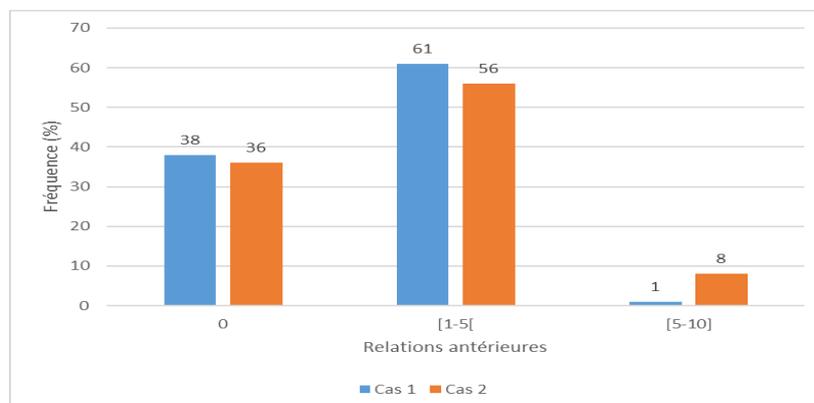


Figure 44: Répartition de la population selon le nombre de relations antérieures.

III.1.8 Tableau clinique des Patients

Le tableau XXVI présente les différents antécédents médicaux susceptibles d'impacter la fertilité des patients. Nous observons que les antécédents les plus fréquents dans la population des Cas étaient la cryptorchidie, les oreillons, la varicelle, la varicocèle, et une fièvre récente. Toutefois, le tableau XXVII indique les antécédents médicaux que les plus à risque dans notre population étaient, la cryptorchidie, les oreillons, la varicelle et la varicocèle (OR>1).

Tableau XXVI: Distribution de la population d'étude selon les antécédents médicaux

Variable	Modalités	Témoins (%)	Cas 1 (%)	Cas 2 (%)
Cryptorchidie	NON	97,674	93,443	88,000
	OUI	2,326	6,557	12,000
Oreillons	NON	76,744	49,180	64,000
	OUI	13,953	39,344	26,667
	Pas de réponse	9,302	11,475	9,333
Varicelle	NON	55,814	36,066	40,000
	OUI	32,558	52,459	54,667
	Pas de réponse	11,628	11,475	5,333
Varicocèle	NON	88,372	78,689	70,667
	OUI	11,628	21,311	29,333
Hypertension art	NON	100,000	95,082	98,667
		0	4,918	1,333
Diabète	NON	97,674	95,082	92,000
	OUI	2,326	4,918	8,000
Fièvre récente	NON	74,419	68,852	74,667
	OUI	25,581	31,148	25,333
Paludisme récent	NON	65,116	75,410	69,333
	OUI	34,884	24,590	30,667
Radiochimiothérapie	NON	97,674	96,721	94,667
	OUI	2,326	3,279	5,333

Tableau XXVII: Régression logistique des antécédents médicaux les plus déterminants.

<i>Variable</i>	<i>Odds ratio</i>
Cryptorchidie	2,763
Oreillons	2,677
Varicocèle	2,042
Varicelle	1,735
Radiochimiothérapie	1,545
Fièvre récente	1,402
Hypertension art	1,384
Diabète	1,182

III.1.9 Antécédents chirurgicaux

La distribution des patients en fonction des antécédents chirurgicaux rapportée dans le tableau XXVIII et XXIX indique que la chirurgie abdominale/pelvienne et l'ablation d'un testicule étaient les antécédents chirurgicaux les plus à risque pour nos patients (OR>1).

Tableau XXVIII: Distribution de la population d'étude selon les antécédents chirurgicaux

<i>Variable</i>	<i>Modalités</i>	<i>Témoins (%)</i>	<i>Cas 1 (%)</i>	<i>Cas 2 (%)</i>
Chirurgie abdominale ou pelvienne	NON	100	100	93,333
	OUI	0	0	6,667
Operation sur les testicules	NON	95,349	96,721	96
	OUI	4,651	3,279	4
Cure de hernie	NON	90,698	98,361	96,000
	OUI	9,302	1,639	4,000
Orchidectomie (ablation d'un seul testicule)	NON	100	100	97
	OUI	0	0	3

Tableau XXIX: Régression logistique des antécédents chirurgicaux les plus déterminants.

<i>Facteurs</i>	<i>Odds ratio</i>
Orchidectomie (ablation d'un seul testicule)	4,925
Chirurgie abdominale ou pelvienne	2,255

III.1.10 Sexualité des patients

Au regard des résultats rapportés dans le tableau XXX nous pouvons dire que de manière générale, les patients avaient une sexualité satisfaisante. De plus, nos patients avaient une moyenne de 2 rapports sexuels non protégés avec leurs compagnes par semaine. Toutefois, les Cas utilisaient plus fréquemment des lubrifiants que les témoins.

Pour ce qui est de la libido (désir sexuel), la figure 45 nous montre que les patients du groupe de Cas 1 avaient en moyenne une libido supérieure à celle des Cas 2 et des témoins.

Tableau XXX: Distribution de la population d'étude en fonction de leur sexualité

Variabes	Modalités	Témoins (%)	Cas 1 (%)	Cas 2 (%)
Erections	NON	0	0	1,333
	OUI	100	100	98,667
Ejaculations ante-portas (avant la pénétration)	NON	100	91,8	92
	OUI	0	8,197	8
Utilisation de lubrifiants	NON	95	95	92
	OUI	4,6	4,9	8
Nombre de rapports/semaine (médiane (1^{er}-3^{ème} quartile))		2 (1-3)	2 (1-3)	2 (1-3)

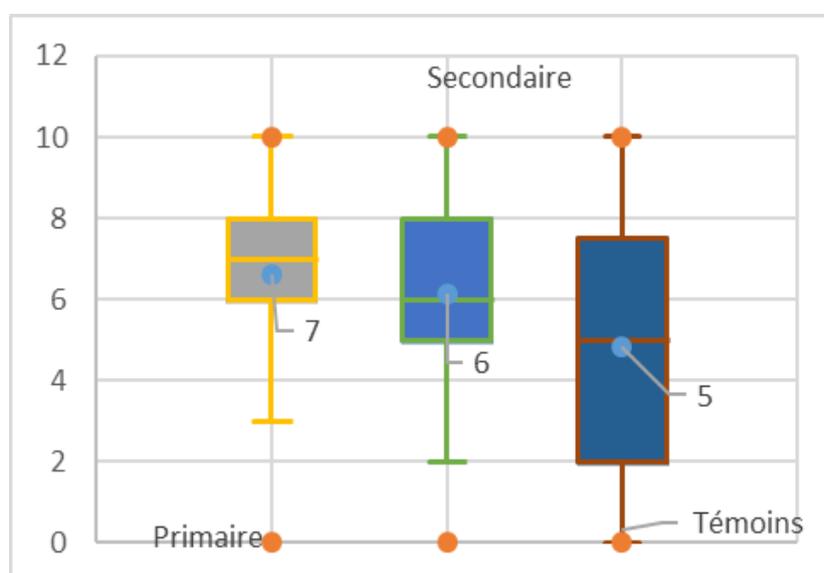


Figure 45: Distribution de la population d'étude selon leur libido.

III.1.11 Alimentation et comportements à risque

III.1.11.1 Habitudes alimentaires

Les habitudes alimentaires des patients sont répertoriées dans le tableau XXXI Il en ressort que les Cas consommaient plus de Fast-foods, d'aliments gras, de café et de sucreries que les témoins. Toutefois, le tableau XXXII qui suit, montre que les habitudes alimentaires les plus à risque pour la population étaient la consommation excessive de Fast-foods, d'aliments gras et de sucreries.

Tableau XXXI: Distribution de la population d'étude selon leurs habitudes alimentaires.

Variable	Modalités	Témoins (%)	Cas 1 (%)	Cas 2 (%)
Fast Food	Enormément	2,326	4,918	6,667
	Jamais	27,907	34,426	30,667
	Souvent	69,767	60,656	62,667
Aliments gras	Enormément	6,977	18,033	18,667
	Jamais	11,628	8,197	8,000
	Souvent	81,395	73,770	73,333
Viande rouge	Enormément	20,930	16,393	18,667
	Jamais	9,302	9,836	2,667
	Souvent	69,767	73,770	78,667
Produits laitiers	Enormément	16,279	13,115	6,667
	Jamais	9,302	3,279	6,667
	Souvent	74,419	83,607	86,667
Café	Enormément	4,651	13,115	8,000
	Jamais	13,953	32,787	24,000
	Souvent	81,395	54,098	68,000
Sucreries	Enormément	13,953	32,787	13,333
	Jamais	4,651	3,279	8,000
	Souvent	81,395	63,934	78,667

Tableau XXXII: Régression logistique des habitudes alimentaires liés à l'infertilité

<i>Facteurs</i>	<i>Odds ratio</i>
Aliments gras	3,819
Fast Food	1,961
Sucreries	1,422
Produits laitiers	1,162

III.1.11.2 Comportements à risque

S'agissant des comportements à risque, les plus fréquemment recensés chez les Cas étaient le téléphone dans la poche, travailler avec un ordinateur sur les genoux, porter des vêtements serrés, et la pratique intense que sport (Tableau XXXIII).

En effet, le tableau XXXIV confirme que le téléphone dans la poche, travailler avec un ordinateur sur les genoux, et le port de vêtements serrés sont les comportements les plus prédisposant dans notre population.

Tableau XXXIII: Distribution de la population d'étude selon les comportements à risque

Variable	Modalités	Témoïn (%)	Cas 1 (%)	Cas 2 (%)
Consommation de cigarette	NON	88,372	91,803	88,000
	OUI	11,628	8,197	12,000
Consommation d'alcool	NON	20,930	32,787	22,667
	OUI	79,070	67,213	77,333
Téléphone dans la poche	Enormément	37,209	36,066	45,333
	Jamais	16,279	11,475	9,333
	Souvent	46,512	52,459	45,333
Travail avec l'ordinateur sur les genoux	Enormément	0	4,918	4,000
	Jamais	58,140	42,623	40,000
	Souvent	41,860	52,459	56,000
Port de vêtements serrés	Enormément	0	4,918	5,333
	Jamais	41,860	31,148	37,333
	Souvent	58,140	63,934	57,333
Pratique du sport	Enormément	11,628	9,836	14,667
	Jamais	11,628	19,672	21,333
	Souvent	76,744	70,492	64,000

Tableau XXXIV: Régression logistique des comportements à risque liés à l'infertilité

Facteurs	Odds ratio
Port de vêtements serrés	5,240
Travail avec l'ordinateur sur les genoux	3,453
Téléphone dans la poche	1,476
Utilisation de lubrifiants	1,217

III.1.12 Fréquence des infections à HIV, Chlamydiae, Syphilis, Mycoplasme, et des hépatites B et C.

L'étude de la fréquence des infections chez nos patients (Tableau XXXV) montre que l'infection la plus fréquente dans la population générale était celle à *Chlamydiae trachomatis*. L'analyse des infections les plus à risque (Tableau XXXVI) indique que les infections les plus significativement liés à l'infertilité étaient les chlamydioses et l'hépatite B.

Tableau XXXV: Distribution de la population d'étude en fonction de l'existence d'une infection.

<i>Variable\Statistique</i>	<i>Modalités</i>	<i>Témoins (%)</i>	<i>Cas 1 (%)</i>	<i>Cas 2 (%)</i>
Chlamydirose	Négatif	69,767	72,131	73,333
	Positif	30,233	27,869	26,667
Infection à Mycoplasme	Négatif	93,023	90,164	90,667
	Positif	6,977	9,836	9,333
Syphilis	Négatif	93,023	96,721	88,000
	Positif	6,977	3,279	12,000
SIDA	Négatif	97,674	98,361	94,667
	Positif	2,326	1,639	5,333
Hépatite B	Négatif	95,349	98,361	97,333
	Positif	4,651	1,639	2,667
Hépatite C	Négatif	100,000	98,361	100,000
	positif	0,000	1,639	0,000

Tableau XXXVI: Régression logistique des infections liées à l'infertilité

<i>Facteurs</i>	<i>Odds ratio</i>
Hépatite B	2,425
Chlamydirose	1,351

En plus des facteurs déterminants, environ 30% à 50% des cas d'infertilité masculine dans le monde sont liés à une mauvaise qualité du sperme (Momo et *al.*, 2019). Au Cameroun, la prévalence de l'infertilité reste mal connue (Momo et *al.*, 2019). Les caractéristiques des spermatozoïdes des hommes infertiles doivent encore être décrites dans notre contexte camerounais pour une meilleure gestion de l'infertilité masculine. Cette troisième partie de notre étude vise à évaluer le profil spermatique des hommes infertiles fréquentant les structures de santé à Yaoundé.

III.2 Analyse qualitative et quantitative du sperme

La figure 46 ci-dessous présente la distribution des patients selon la durée d'abstinence avant l'examen de spermogramme. Il en ressort que la grande majorité (~80%) des patients observaient 3 à 6 jours d'abstinence avant le prélèvement de sperme.

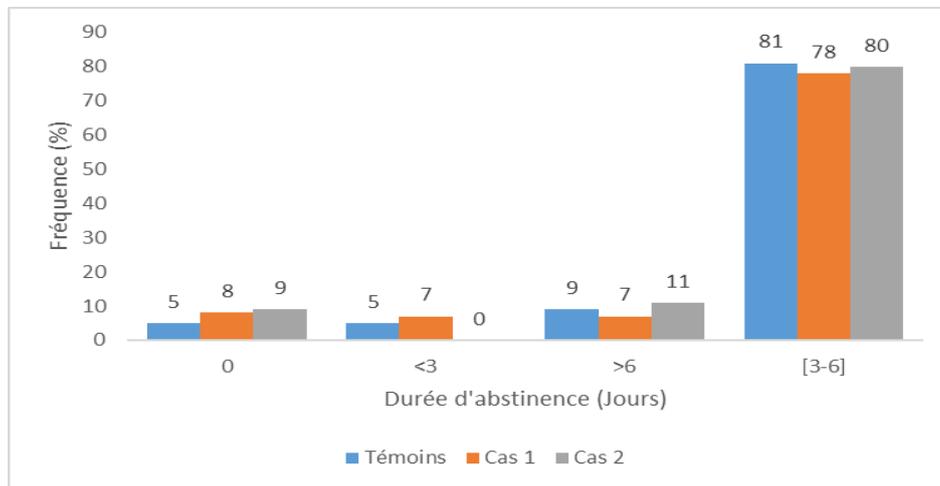


Figure 46: Distribution de la population d'étude selon la durée d'abstinence avant le prélèvement de sperme.

III.2.1 Evaluation qualitative

L'analyse de la couleur du sperme des patients, présentée à la figure 47 montre que la grande majorité des patients (96%) présentaient une couleur normale du sperme, à savoir gris opalescente.

S'agissant du temps de liquéfaction (Figure 48), 78% des patients présentaient un temps de liquéfaction normal (≥ 30 minutes).

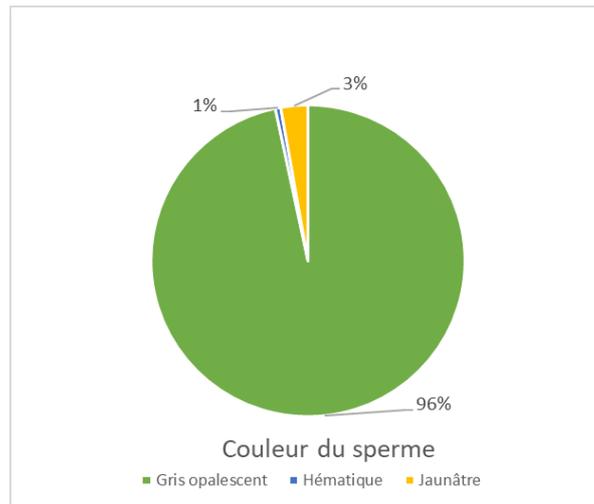


Figure 47: Distribution de la population d'étude selon la couleur du sperme

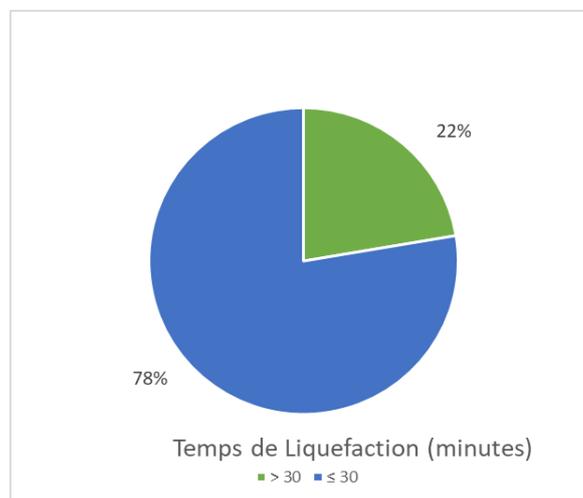


Figure 48: Distribution de la population d'étude selon le temps de liquéfaction du sperme.

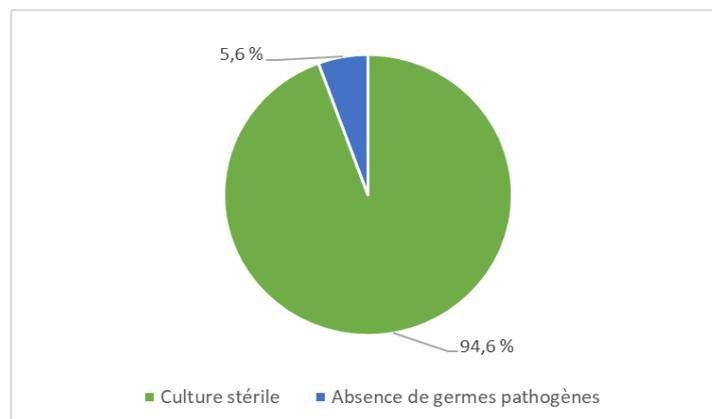


Figure 49: Répartition de la population en fonction des résultats de spermoculture. Les résultats de spermoculture sont présentés dans la figure 49. Nous constatons qu'aucune bactérie pathogène n'avait été retrouvée dans le sperme des patients. Egalement, nous n'avons pas retrouvé de *Trichomonas vaginalis* dans les échantillons de sperme de nos patients.

III.2.2 Evaluation quantitative

III.2.2.1 Comparaison des moyennes des paramètres du sperme au sein de la population d'étude.

Le tableau XXXVII présente les caractéristiques de sperme de la population d'étude. Le test de comparaison des moyennes au sein des deux groupes de Cas et témoins (Figure 50) montre que les Cas avaient des valeurs plus faibles concernant le volume ($p > 0,05$), la concentration en spermatozoïdes ($p < 0,0001$), le nombre total de spermatozoïdes ($p < 0,0001$), la mobilité progressive ($p < 0,0001$), la vitalité ($p < 0,0001$) et le pourcentage total de formes normales ($p > 0,05$). Ils avaient des valeurs plus élevées de pH ($p = 0,020$) et la viscosité ($p > 0,05$).

Nous avons également comparé les paramètres du sperme au sein de la population des Cas (Tableau XXXVIII). Quand bien même les Cas 1 ont présenté des valeurs supérieures du pH, de la concentration en spermatozoïdes, de vitalité et du pourcentage de formes normales comparé au Cas 2, ils avaient également des valeurs inférieures notamment de la viscosité, du volume, et de la mobilité des spermatozoïdes comparé aux Cas 2. Le test de comparaison des moyennes au sein des deux groupes (Figure 51) montre qu'il n'existait aucune différence significative au sein des deux groupes de Cas.

Tableau XXXVII: Caractéristiques générales du sperme de la population générale. Les valeurs sont exprimées en médiane (1^{er} -3^{ème} quartile).

<i>Caractéristiques de la population</i>	<i>Cas</i>	<i>Témoin</i>	<i>Valeurs normales (WHO, 2010)</i>
Volume (ml)	2,7 (1,9-3,5)	3 (1,6-4)	1,5 ml
pH	8,5 (8-9)	8 (8-8,25)	$\geq 7,2$
Viscosité	1(0-2)	0 (0-2)	0
Concentration spermatozoïdes (million/ml)	7 (1,3-13,6)	42,2 (20,75-59,5)	$15 \times 10^6/l$
Mobilité totale (%)	34 (20,5-50)	65 (60,8-73,5)	40%
Vitalité (%)	41(27-56)	72 (65-80)	58%
Formes normales (%)	86 (80-89)	87 (83,3-89)	4%

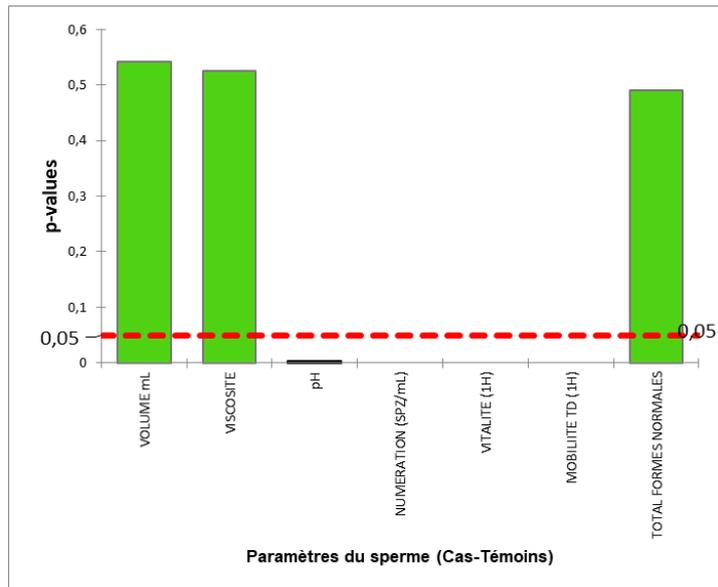


Figure 50: Comparaison des moyennes des paramètres du sperme au sein de la population totale.

Tableau XXXVIII: Caractéristiques générales du sperme dans le groupe de Cas. Les valeurs sont exprimées en médiane (1^{er} -3^{ème} quartile).

<i>Caractéristiques de la population</i>	<i>Cas 1</i>	<i>Cas 2</i>	<i>Valeurs normales (WHO, 2010)</i>
Volume (ml)	2,5 (2-3,4)	3 (2-4)	1,5 mL
pH	8,5 (8-9)	8 (8-9)	≥ 7,2
Viscosité	0 (0-2)	1(0-1,5)	0
Concentration spermatozoides (million/ml)	7,05 (3,05-12,03)	6,85 (1,3-14)	15 x 10 ⁶ /l
Mobilité totale (%)	32 (21-50)	35,5 (20-50)	40%
Vitalité (%)	45 (30-56)	39,5 (26,8-57)	58%
Formes normales (%)	87 (80-90)	85 (81-89)	4%

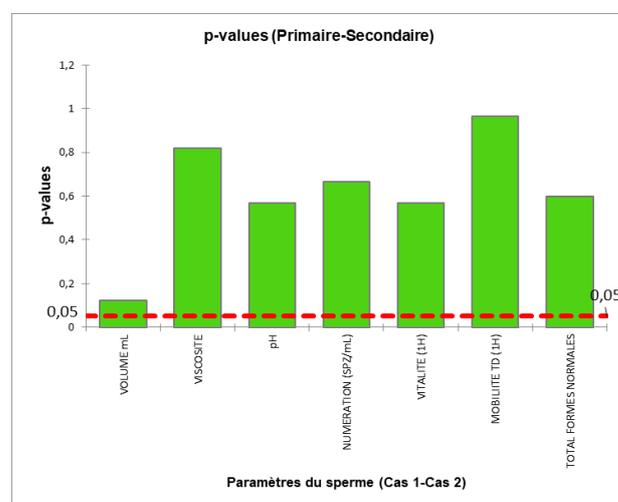


Figure 51: Comparaison des moyennes des paramètres du sperme au sein du groupe de Cas.

III.2.2.2 Répartition des patients selon le nombre de leucocytes

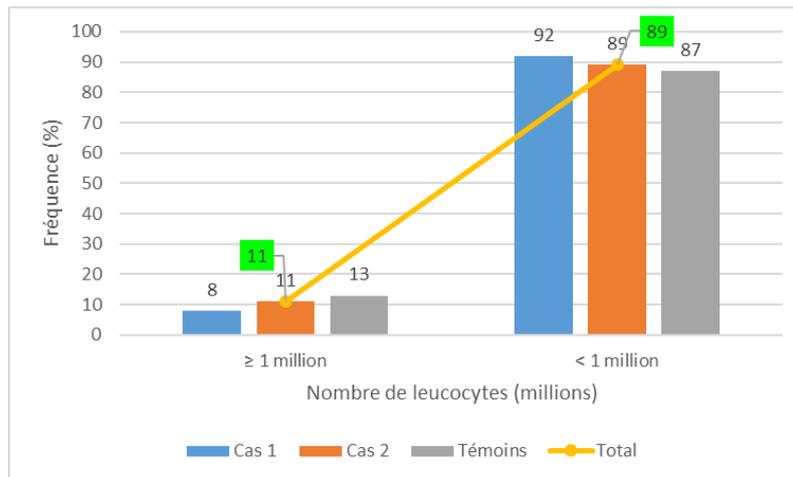


Figure 52: Distribution de la population d'étude en fonction de la présence de leucocytes.

La figure 52 montre que le sperme de plus de 85% des patients contenait moins d'un million de leucocytes.

III.2.3 Etude des anomalies

La figure 53 ci-dessous recense les différents types d'anomalies retrouvées chez les Cas. La distribution des anomalies dans le groupe Cas 1 était très semblable à celle du groupe Cas 2. Toutefois, les anomalies du nombre étaient plus prépondérantes (85% chez les Cas 1 contre 80% chez les Cas 2), suivies des anomalies de la vitalité (76% chez les Cas 1 contre 79% chez les Cas 2), puis des anomalies de la mobilité (60% chez les Cas 1 contre 57% chez les Cas 2), et des anomalies du volume (~12% dans les deux groupes). Aucun de nos Cas n'avaient un pourcentage de formes normales inférieures à la norme.

S'agissant des anomalies du volume présenté à la figure 54 nous observons que la fréquence de l'hypospermie était plus élevée chez les Cas 1 (12%) tandis que seul les Cas 2 avaient des patients en hyperspermie (2%)

Pour ce qui est anomalies du nombre (Figure 55), L'oligospermie légère était prépondérante (50% chez les Cas 1 contre 32,7% chez les Cas 2), ensuite venait l'oligospermie sévère (20% chez les Cas1 contre 28,6% chez les Cas 2).

Le tableau XXXIX rapporte les anomalies de la morphologie les plus fréquentes. Il en ressort que les anomalies de la tête et du flagelle étaient les plus fréquentes tant dans le groupe de Cas 1 que le groupe de Cas 2.

Environ 67% des Cas cumulaient plusieurs des anomalies citées plus haut. La figure 56 présente les différentes associations d'anomalies observées. L'association la plus fréquente était la combinaison Oligospermie + Asthénospermie + Nécrospermie (44% chez les Cas 1 contre 32% chez les Cas 2)

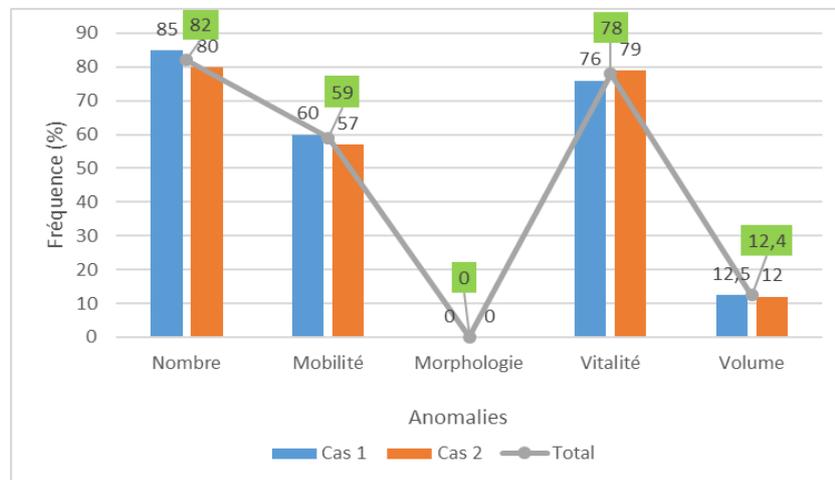


Figure 53: Distribution des Cas selon les types d'anomalies.

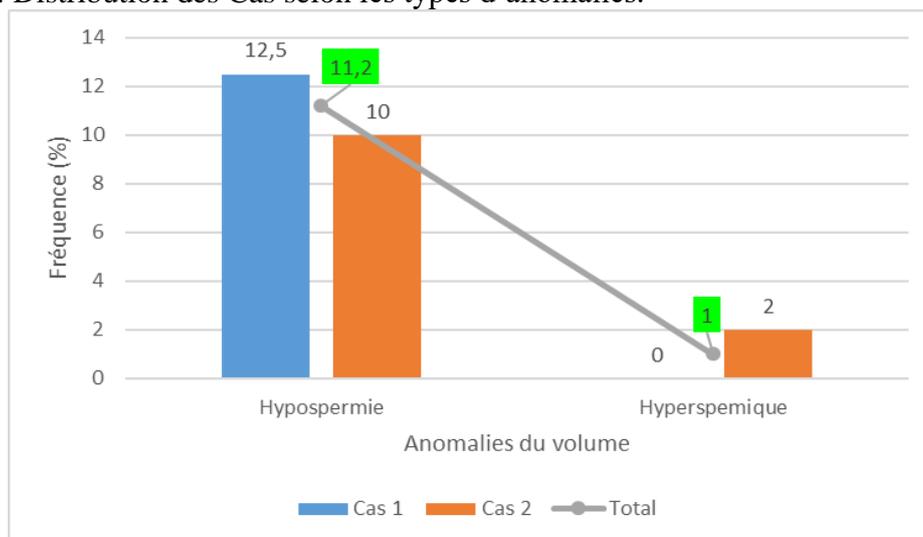


Figure 54: Distribution des Cas selon les anomalies du volume

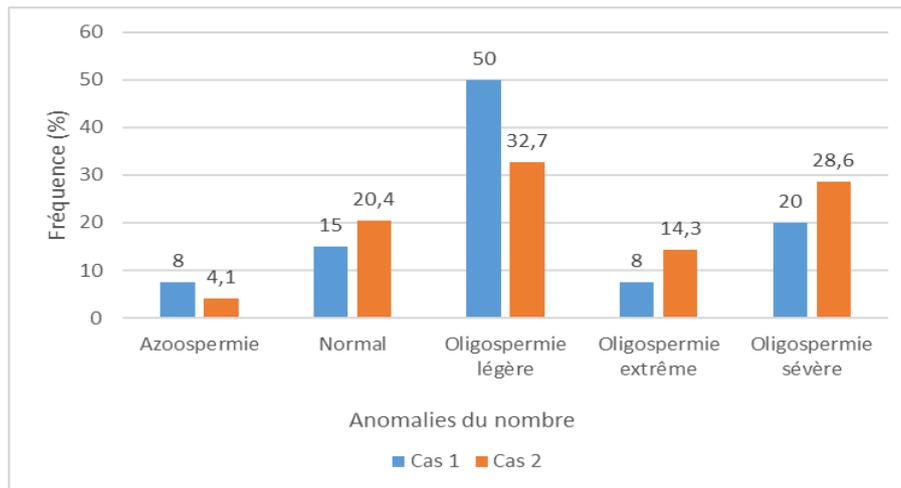


Figure 55: Distribution des Cas selon les anomalies du nombre.

Tableau XXXIX: Distribution des Cas selon le type d'anomalies de la morphologie retrouvées. Les valeurs sont exprimées en médiane (1^{er} -3^{ème} quartile).

<i>Anomalies morphologiques</i>	<i>Cas 1</i>	<i>Cas 2</i>	<i>p-values</i>
<i>Tête (%)</i>	5 (2-7,3)	5 (3-6)	0,585
<i>Pièce intermédiaire (%)</i>	5 (2-10,3)	6 (2-11)	0,382
<i>Flagelle (%)</i>	3 (0-4)	2 (0-4)	0,914

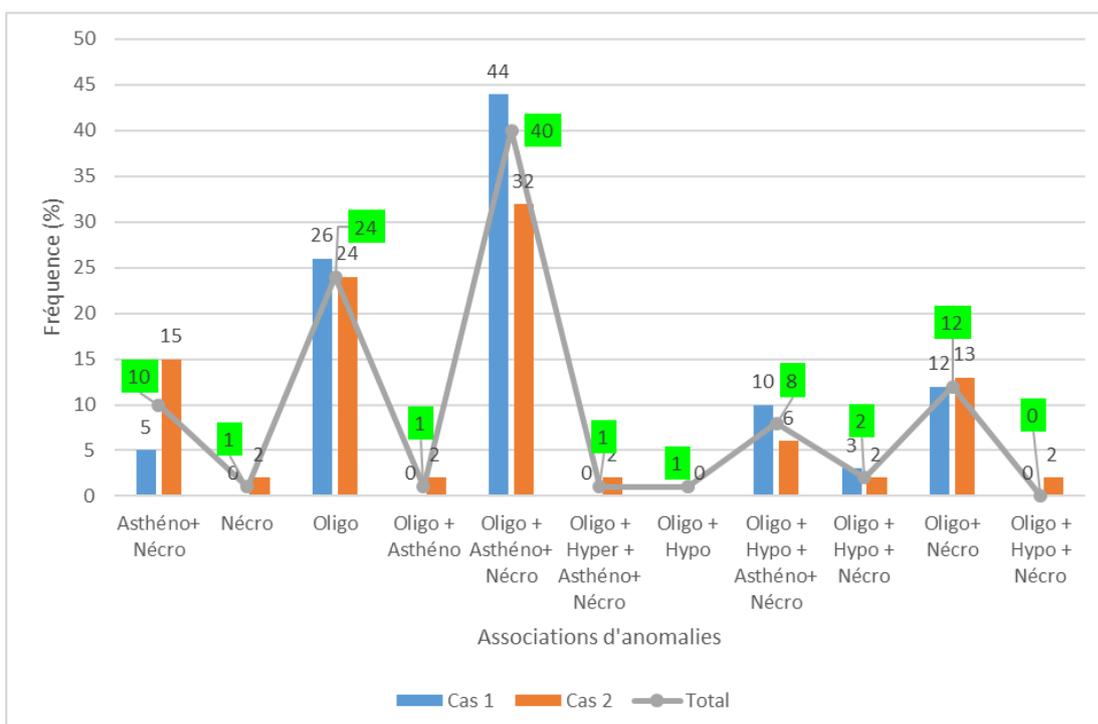


Figure 56: Distribution des Cas en fonction des types d'association d'anomalies retrouvées.

III.2.4 Tests d'association des paramètres du sperme des Cas aux les autres variables

L'étude de l'évolution des paramètres du sperme en fonction des classes d'âge (Tableau XL) montre que l'âge était négativement corrélé au volume ($r=-0,075$; $p=0,545$), la numération des spermatozoïdes ($r=-0,162$; $p=0,185$), la vitalité ($r=-0,126$; $p=0,303$) et la mobilité ($r=-0,155$; $p=0,205$) et positivement corrélée à la viscosité ($r=0,079$; $p=0,521$), le pH ($r=0,124$; $p=0,312$) et le pourcentage de formes normales ($r=0,001$; $p=0,993$).

Exception faite de la numération des spermatozoïdes ($r=-0,212$; $p=0,082$) qui diminuait avec l'IMC, l'IMC était positivement corrélé au volume ($r=0,188$; $p=0,123$), la viscosité ($r=0,036$; $p=0,770$), le pH ($r=0,069$; $p=0,571$), la vitalité ($r=0,027$; $p=0,822$), la mobilité ($r=0,004$; $p=0,973$) et le pourcentage de formes normales ($r=0,031$; $p=0,799$).

Nos résultats (Tableau XLI) montrent que la durée d'abstinence était négativement corrélée à la viscosité ($r=-0,044$; $p=0,673$) et le pH ($r=-0,074$; $p=0,483$), et positivement corrélée au volume ($r=0,045$; $p=0,659$), à la concentration en spermatozoïdes ($r=0,130$; $p=0,216$), la vitalité ($r=0,099$; $p=0,344$), la mobilité ($r=0,132$; $p=0,209$) et le pourcentage de formes normales ($r=0,021$; $p=0,845$).

Le tableau XLII présente les facteurs les plus déterminants pour une baisse de la numération. Il en ressort que les antécédents cliniques (plus précisément, la cryptorchidie, les oreillons, la varicelle, et la varicocèle), chirurgicaux, la profession, les comportements à risque (plus précisément, la consommation d'alcool, le port du téléphone dans la poche et le port de vêtements serrés) présentaient un facteur de risque plus important.

Tableau XL: Corrélations des paramètres du sperme par l'âge et l'IMC

<i>Variables</i>	<i>Age</i>		<i>IMC</i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Volume	-0,075	0,542	0,188	0,123
Viscosité	0,079	0,521	0,036	0,770
pH	0,124	0,312	0,069	0,571
Numération	-0,162	0,185	-0,212	0,082
Vitalité	-0,126	0,303	0,027	0,822
Mobilité	-0,155	0,205	0,004	0,973
Total formes normales	0,001	0,993	0,031	0,799

Tableau XLI: Corrélation des paramètres du sperme par la durée d'abstinence.

Variables	Durée d'abstinence	
	r	p
Volume	0,045	0,659
Viscosité	-0,044	0,673
pH	-0,074	0,483
Numération	0,130	0,216
Vitalité	0,099	0,344
Mobilité	0,132	0,209
Total formes normales	0,021	0,845

Tableau XLII: Régression logistique des facteurs déterminants significativement liés à une baisse de la numération des spermatozoïdes

Facteurs	p
Antécédents cliniques (Cryptorchidie, Oreillons, Varicelle, Varicocèle)	< 0,0001
Antécédents chirurgicaux	0,0006
Profession	< 0,0001
Comportements à risque (Consommation d'alcool, le port du téléphone dans la poche et le port de vêtements serrés)	0,016

Certains marqueurs biochimiques sont importants pour expliquer une baisse de la qualité du sperme. Ils ont ainsi été établis comme de bons indicateurs de la fertilité masculine humaine. Une compréhension des facteurs affectant les caractéristiques du sperme est essentielle pour bien comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'infertilité masculine. Afin de mieux comprendre et cerner la baisse de la qualité du sperme observée dans notre population, Cette 3^{ème} partie vise à étudier les concentrations de quelques marqueurs biochimiques chez les patients présentant des anomalies du spermogramme comparativement aux normospermiques.

III.3.1 Dosage du Fructose séminal

III.3.1.1 Distribution de la population d'étude en fonction de la concentration en fructose

La teneur en fructose rapportée dans le tableau XLIII indique que la grande majorité de la population avait un taux de fructose supérieur à 13µM/éjaculat. Comparé aux témoins, la population de Cas avait un taux significativement supérieur de fructose ($p=0,004$). Les Cas 2 avaient un taux de fructose supérieur aux Cas 1 mais ce n'était pas significatif ($p=0,077$).

Tableau XLIII: Distribution de la population en fonction de la concentration en fructose séminal. Les valeurs sont exprimées en médiane (1^{er} -3^{ème} quartile).

	Témoins	Cas 1+Cas 2	<i>p</i> -value	Cas 1	Cas 2	<i>p</i> -value
Fructose	64	87		84	104	
(µM/Ejaculat)	(41-118)	(44-124)	0,004	(49-108)	(51-147)	0,077

III.3.1.2 Tests d'association entre le fructose et d'autres variables dans le groupe de Cas

Le tableau XLIV et la figure 57 nous permettent d'observer que la concentration en fructose était négativement corrélée à l'âge ($r=-0,038$; $p=0,731$) mais positivement corrélée à l'IMC ($r=0,232$; $p=0,035$).

La corrélation des paramètres du sperme en fonction du taux de fructose (Tableau XLV et Figure 58) révèle une corrélation positive entre le fructose et le volume ($r=0,866$; $p<0,0001$), le pH ($r=0,070$; $p=0,561$), le pourcentage total de formes normales ($r=0,122$; $p=0,307$) la vitalité ($r=0,037$; $p=0,760$) et la mobilité ($r=0,008$; $p=0,949$). Également, nous avons trouvé une corrélation négative entre le fructose et la numération des spermatozoïdes ($r=-0,206$; $p=0,082$) et la viscosité ($r=-0,184$; $p=121$) ;

Tableau XLIV: Corrélation du fructose par l'âge et l'IMC

Variables	Age		IMC	
	r	p	r	p
Fructose	-0,038	0,731	0,232	0,035

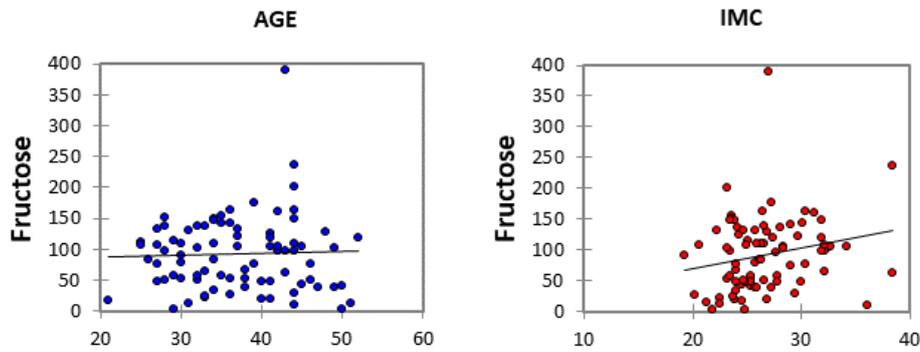


Figure 57: Régression linéaire du fructose par l'âge et l'IMC.

Tableau XLV: Corrélation des paramètres du sperme par le Fructose

Variables	FRUCTOSE $\mu\text{M}/\text{Ejaculat}$	
	r	p
Total formes normales	0,122	0,307
Vitalité	0,037	0,760
Mobilité	0,008	0,949
Numération	-0,206	0,082
Volume	0,866	<0,0001
Viscosité	-0,184	0,121
pH	0,070	0,561

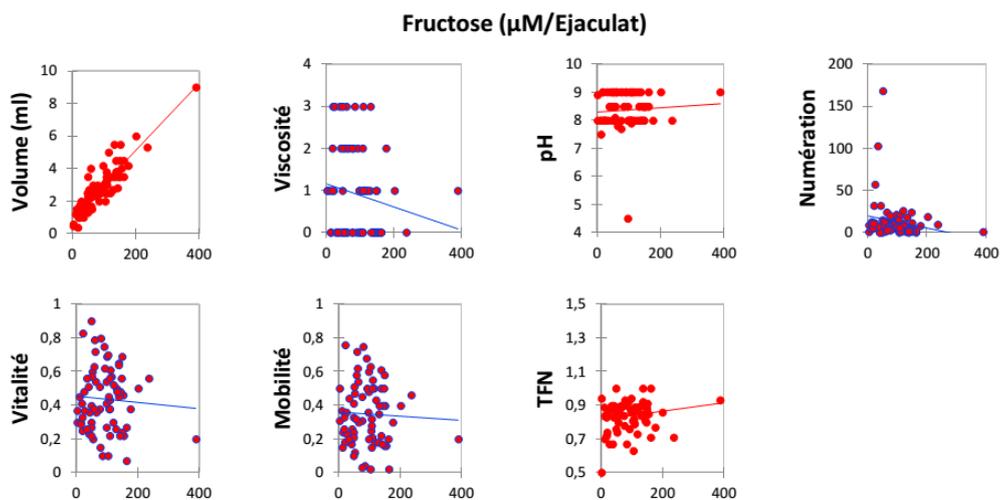


Figure 58: Régression linéaire entre le fructose et les paramètres du sperme

III.3.2 Dosage de la FSH et de l’Inhibine B

III.3.2.1 Distribution de la population en fonction des concentrations en Inhibine B et FSH

L’évaluation des concentrations sériques en Inhibine B et FSH rapportée dans le tableau XLVI indique que les Cas avaient des concentrations plus faibles d’Inhibine B ($p=0,216$) et plus élevés de FSH ($p=0,964$). Plus particulièrement, les Cas 1 avaient des concentrations plus élevées en Inhibine B ($p=0,036$) et plus faibles en FSH ($p=0,978$) que les Cas 2.

Tableau XLVI: Distribution de la population en fonction des concentrations en Inhibine B et FSH.

	Témoins	Cas 1+Cas 2	<i>p</i> -value	Cas 1	Cas 2	<i>p</i> -value
Inhibine B (pg/ml)	158,1 (125,38-221)	137 (56,85- 225)	0,216	169,6 (72- 244)	97 (40-200)	0,036
FSH (UI/l)	4,7 (2,14- 9,46)	6,08 (2,3- 13,6)	0,964	6,08 (1,5- 13,5)	6,95 (2,62- 13,8)	0,978

III.3.2.2 Corrélation entre les hormones et les autres variables dans le groupe de Cas

La corrélation entre les hormones et les tranches d’âge montre que l’Inhibine B diminuait avec l’âge ($r=-0,365$; $p=0,001$) et inversement, la FSH augmentait avec l’âge ($r=0,289$; $p=0,001$) (Tableau XLVII). De même, l’Inhibine B diminuait significativement avec l’IMC ($r=-0,361$; $p=0,001$) et la FSH tendait à augmenter avec l’IMC ($r=0,162$; $p=0,148$) (Tableau XLVIII).

Le tableau XLVII et la figure 60 montrent que l’Inhibine B était négativement corrélée à la FSH ($r= -0,509$; $p<0,0001$).

La corrélation entre les hormones Inhibine B, FSH et les paramètres du sperme rapportée dans le tableau XLVIII et la Figure 59 indiquent que l’inhibine B était positivement corrélée au pourcentage de formes normales, la concentration en spermatozoïdes et au volume et négativement corrélée à la vitalité, la mobilité, la viscosité et le pH. La FSH quant à elle était positivement corrélée au Pourcentage de formes normales, au volume et au pH ; elle était négativement corrélée à la vitalité, la mobilité, la numération et la viscosité.

Pour ce qui est de la corrélation avec le fructose, la Figure 61 montre que tandis que l’Inhibine B était positivement corrélée au fructose ($r=0,090$; $p=0,423$), la FSH était négativement corrélée ($r=-0,054$; $p=0,632$).

Tableau XLVII: Corrélation des hormones FSH et Inhibine B par l'âge et l'IMC

Variables	AGE		IMC	
	r	p	r	p
Inhibine B	-0,365	0,001	-0,361	0,001
FSH	0,289	0,001	0,162	0,148

Tableau XLVIII: Corrélation entre l'Inhibine B, la FSH et les paramètres du sperme

Variables	FSH		Inhibine B	
	r	p	r	p
Total formes normales	0,000	1,000	0,148	0,215
Vitalité	-0,034	0,776	-0,015	0,902
Mobilité	-0,005	0,965	-0,027	0,819
Numération	-0,191	0,108	0,116	0,332
Volume	0,076	0,525	0,171	0,152
Viscosité	-0,083	0,487	-0,064	0,590
FSH	1	0	-0,509	<0,0001
INB	-0,509	<0,0001	1	0
pH	0,149	0,212	-0,143	0,231

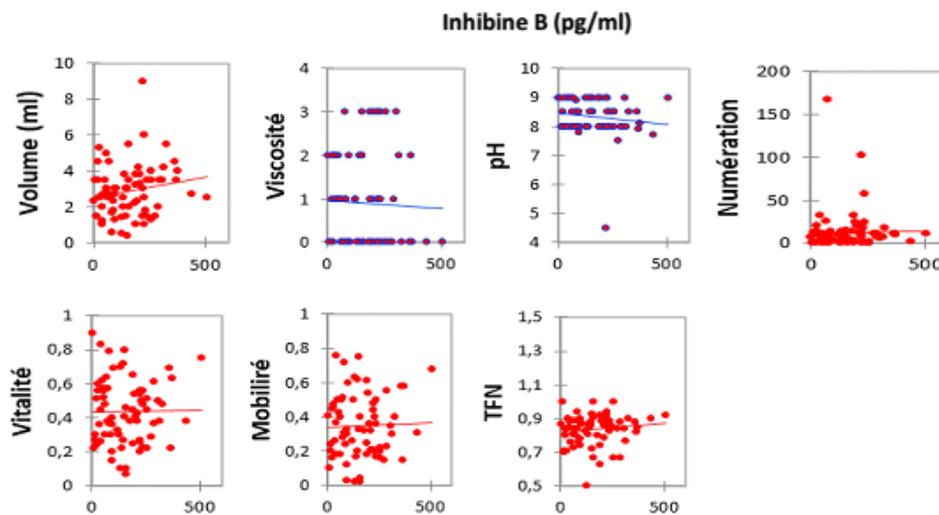


Figure 59: Régression linéaire entre FSH, Inhibine B et les paramètres du sperme

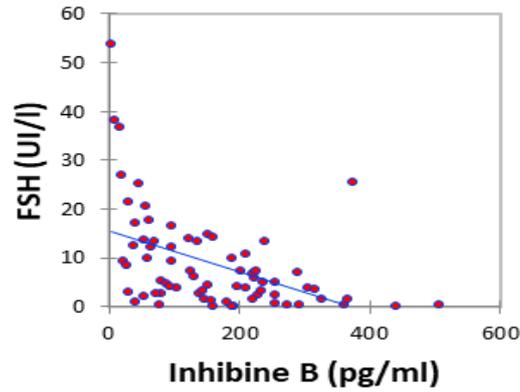


Figure 60: Régression linéaire entre FSH et Inhibine B

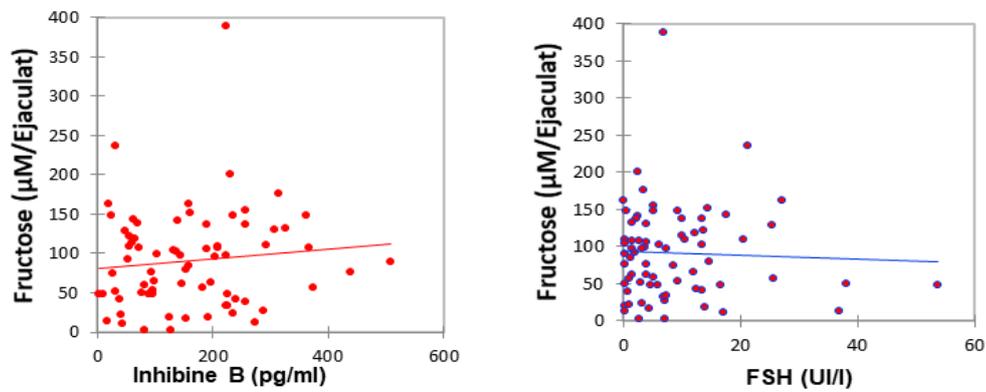


Figure 61: Régression logistique entre FSH, Inhibine B et le Fructose

III.3.3 Etude du statut antioxydant et oxydant

III.3.3.1 Les marqueurs du statut antioxydant

III.3.3.1.1 Distribution de la population en fonction de la teneur séminale en marqueurs antioxydants

La distribution de la population en fonction des marqueurs antioxydants rapportée dans le tableau XLIX indique que les Cas avaient des concentrations plus faibles de Catalase ($p=0,880$), Glutathion réduit ($p=0,558$) et Glutathion peroxydase ($p<0,0001$) comparé aux témoins.

Comparé aux Cas 1, les Cas 2 avaient des concentrations plus faibles de Catalase ($p=0,109$), SOD ($p=0,623$), Glutathion peroxydase ($p<0,0001$) et FRAP ($p=0,521$).

Tableau XLIX: Distribution de la population en fonction de la teneur séminale en marqueurs antioxydants

	Témoins	Cas 1+Cas 2	<i>p</i> -value	Cas 1	Cas 2	<i>p</i> -value
Catalase (µM H₂O₂/min/ml)	1,53 (0,88-4)	1,45 (0,68- 4,23)	0,880	2,19 (0,93-6,1)	1,2 (0,57- 3,4)	0,109
SOD (UI/ml)	0,160 (0,8- 0,41)	0,163 (0,08- 0,44)	0,855	0,21 (0,08- 0,54)	0,13 (0,08- 0,32)	0,623
Glutathion réduit (µmol/l)	3,125 (1,4- 4,24)	2,68 (1,69- 4,17)	0,558	2,68 (1,87- 4,13)	2,8 (1,6- 4,2)	0,824
Glutathion peroxydase (UI/ml)	0,086 (0,055- 0,116)	0,085 (0,055- 0,125)	< 0,0001	0,098 (0,07- 0,145)	0,08 (0,05-118)	< 0,0001
FRAP (µmol/l)	203,4 (178- 241,5)	209,8 (179,5- 235,3)	0,799	213 (171,8- 234,7)	209,2 (180,8- 236)	0,521
Vitamine E (µM)	160,7 (124,6- 203,35)	168,8 (133- 218)	0,326	161,04 (128,2- 204,3)	177,3 (139,4- 223,8)	0,316

III.3.3.1.2 Corrélation entre les marqueurs antioxydants et les autres variables dans le groupe de Cas.

Contrairement à la Glutathion peroxydase ($r=0,122$; $p=0,270$) et la vitamine E ($r=0,078$; $p=0,477$), La Catalase ($r=-0,020$; $p=0,854$), la SOD ($r=-0,013$; $p=0,905$), le Glutathion réduit ($r=-0,129$; $p=0,242$) et la FRAP ($r=-0,131$; $p=0,236$) étaient négativement corrélés à l'âge (Tableau L).

Quant à l'IMC, elle était positivement corrélée au Glutathion peroxydase ($r=0,145$; $p=0,187$), la vitamine E ($r=0,012$; $p=0,912$) et le Glutathion réduit ($r=0,109$; $p=0,323$) et négativement corrélée à la SOD (**$r=-0,315$; $p=0,004$**), la Catalase ($r=-0,192$; $p=0,080$), et la FRAP ($r=-0,020$; $p=0,859$) (Tableau L).

Le tableau LI et la figure 62 indiquent qu'à quelques exceptions près, le volume, la numération, la vitalité, la mobilité et le pourcentage de formes normales augmentait lorsque

les concentrations en antioxydants augmentaient. Quant aux anomalies morphologiques (tête, pièce intermédiaire et queue), elles diminuaient lorsque les concentrations en antioxydants augmentaient.

Exception faite de la FRAP, le fructose était inversement proportionnel aux marqueurs antioxydants. Quant aux hormones Inhibine B et FSH, nous avons observé des corrélations inverses et opposées vis-à-vis des marqueurs antioxydants. En effet, l’Inhibine B étaient positivement corrélée au Glutathion peroxydase, à la Catalase et la SOD et négativement corrélée au Glutathion réduit, la FRAP et la vitamine E (Tableau LII et Figure 63).

Tableau L: Corrélation des marqueurs antioxydants par l’âge et l’IMC.

Variables	AGE		IMC	
	r	p	r	p
Glutathion Peroxydase	0,122	0,270	0,145	0,187
SOD	-0,013	0,905	-0,315	0,004
Catalase	-0,020	0,854	-0,192	0,080
Vitamine E	0,078	0,477	0,012	0,912
Glutathion réduit	-0,129	0,242	0,109	0,323
FRAP	-0,131	0,236	-0,020	0,859

Tableau LI: Corrélation entre les marqueurs antioxydants et les paramètres du sperme.

Variables	GLUT	FRAP	SOD	CAT	Vit E	Glut
	RED					Perox
Volume	0,047	0,300	-0,345	-0,274	-0,063	0,003
Numération	0,119	0,054	0,269	0,190	0,065	-0,222
Mobilité	0,093	0,180	0,179	0,006	-0,006	0,058
Vitalité	0,078	0,176	0,125	0,089	-0,006	0,095
Total formes normales	0,090	0,152	0,042	0,001	0,094	0,104
Total anomalies queue	-0,031	-0,053	-0,149	-0,235	-0,271	0,008
Total anomalies tête	-0,070	-0,132	0,054	0,070	-0,031	0,074
Total anomalies pièces intermediaires	-0,044	-0,024	-0,001	0,043	-0,105	-0,220

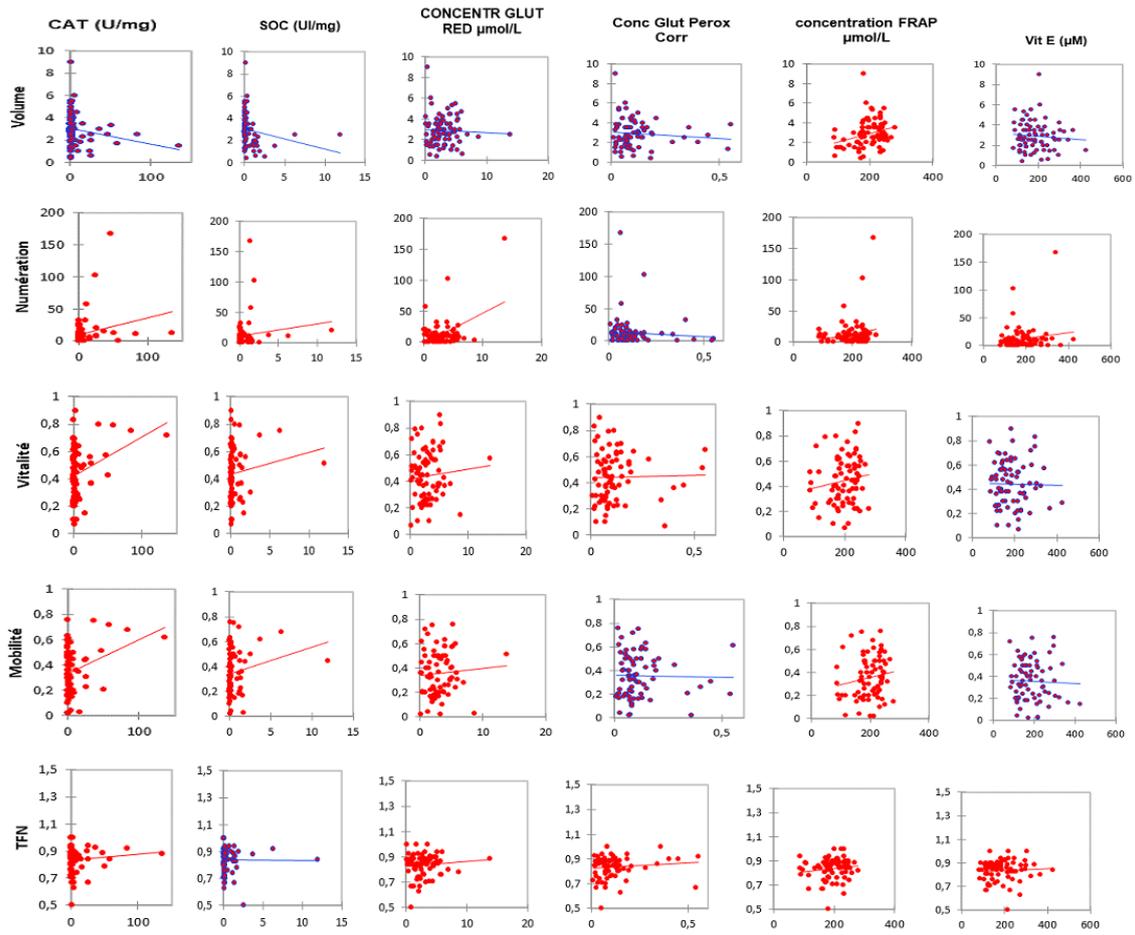


Figure 62: Régression linéaire entre les marqueurs antioxydant et les paramètres du sperme.

Tableau LII: Corrélation entre les marqueurs antioxydants par le fructose et les hormones.

Variables	Glut Perox	GLUT RED µmol/L	FRAP µmol/L	CAT (U/mg)	SOD (UI/mg)	Vit E (µM)
Fructose	-0,028	-0,140	0,110	-0,264	-0,376	-0,108
Concentration Inhibine B	0,079	-0,227	-0,109	0,123	0,224	-0,039
Concentration FSH	0,020	0,059	0,038	-0,045	-0,179	-0,161

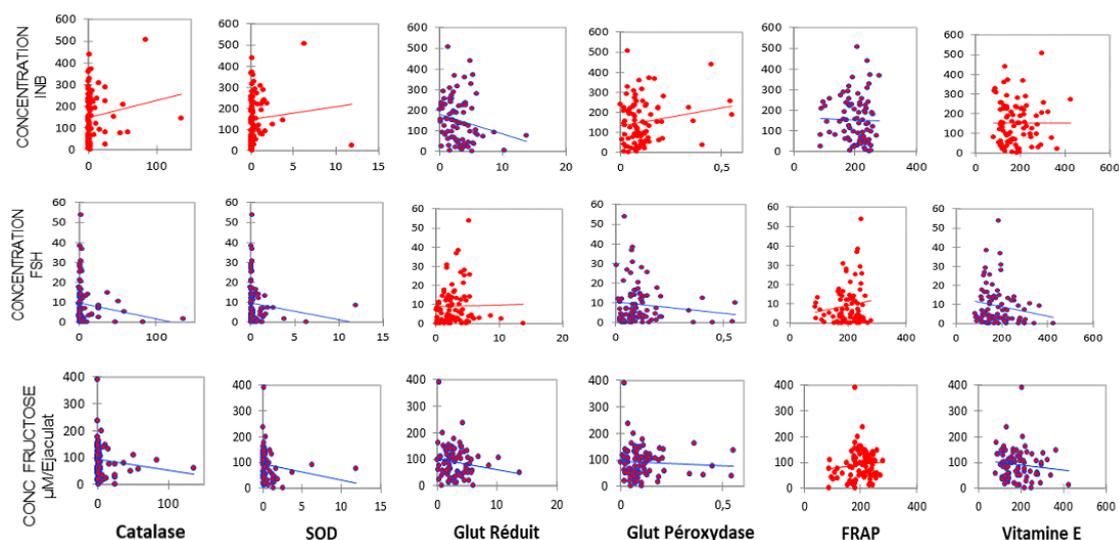


Figure 63: Regression linéaire des marqueurs antioxydants par le fructose et les hormones.

III.3.3.2 Les marqueurs du statut oxydant

III.3.3.2.1 Distribution de la population en fonction de la teneur séminale en marqueurs oxydants

La distribution des marqueurs oxydants rapportés dans le tableau LIII indique qu'exception faite des peroxynitrites ($p=0,039$), les concentrations en peroxydes totaux ($p=0,162$), MDA ($p=1$), et nitrites ($p=0,899$) étaient plus élevées dans le groupe de Cas comparé aux témoins.

Au sein de la population des Cas, les Cas 1 avaient des concentrations plus élevées de peroxydes totaux ($p=0,781$) et MDA ($p=0,689$) et plus faibles de peroxynitrites ($p=0,163$) et nitrites comparé aux Cas 2 ($p=0,766$) (Tableau LIII).

Tableau LIII: Distribution de la population en fonction de la teneur séminale en marqueurs oxydants

	Témoins	Cas 1+Cas 2	<i>p</i> -value	Cas 1	Cas 2	<i>p</i> -value
Peroxydes Totaux (µmol/l)	45 (23,75-78,75)	62,5 (32,5-102)	0,162	63,75 (31,56-99,06)	62,5 (37,5-103,8)	0,781
MDA (µmol/l)	2,94 (1,8-4,74)	3,05 (1,76-5,05)	1,000	3,14 (1,92-5,34)	2,75 (1,73-4,23)	0,689
Péroxynitrites (µmol/l)	6,59 (5,11-7,95)	5,68 (4,77-7,27)	0,039	5,23 (4,3-7,05)	5,68 (4,88-7,4)	0,163
Nitrites	31,42 (17,69-60,67)	38,1 (13,21-62,06)	0,899	36,74 (18,25-59,48)	38,57 (12,14-63,73)	0,766

III.3.3.2.2 Corrélation entre les marqueurs oxydants et les autres variables dans le groupe de Cas.

La corrélation des marqueurs oxydants par l'âge et l'IMC (Tableau LIV) indique qu'excepté les peroxy-nitrites qui étaient négativement corrélés à l'âge, les marqueurs oxydants étaient tous positivement corrélés à l'âge et à l'IMC.

Les tableau LV et figure 64 permettent d'observer que les marqueurs oxydants les plus négativement corrélés aux paramètres du sperme étaient le MDA et les peroxydes totaux. Les anomalies de la morphologie les plus positivement corrélés aux marqueurs oxydants étaient les anomalies de la queue et de la pièce intermédiaire.

La corrélation entre les marqueurs oxydants et les autres paramètres biochimiques (Tableau LVI et Figure 65) étudiés plus haut (Fructose, Inhibine B et FSH) permet d'observer que le Fructose était positivement corrélé aux nitrites ($r=0,131$), MDA ($r=0,208$), Peroxydes totaux ($r=0,465^{**}$), et peroxy-nitrite ($r=0,137$). Inhibine B et FSH présentaient des corrélations inverses vis-à-vis des marqueurs oxydants. En effet, l'Inhibine B était négativement corrélée aux Nitrite ($r=-0,273^{**}$), MDA ($r=-0,282^{**}$) et peroxydes totaux ($r=-0,072$) et positivement corrélée au peroxy-nitrites ($r=0,082$).

Tableau LIV: Corrélations des marqueurs oxydants par l'âge et l'IMC

Variables	Age		IMC	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Nitrites	0,0462	0,697	0,0710	0,549
MDA	0,0729	0,539	0,1587	0,179
Peroxydes totaux	0,1183	0,318	0,2039	0,084
Peroxy-nitrites	-0,2271	0,053	0,2436	0,038

Tableau LV: Corrélation entre les marqueurs oxydants et les paramètres du sperme

Variables	<i>Peroxy-nitrites</i>	MDA	Nitrites	<i>Peroxydes Totaux</i>
Volume	0,216	0,086	0,095	0,360
Viscosité	-0,065	-0,197	-0,118	0,008
Numération	0,002	-0,115	0,073	-0,028
Mobilité	0,063	-0,084	0,087	-0,103
Vitalité	0,014	-0,122	0,107	-0,079
Total formes normales	-0,084	0,062	0,094	0,029
Total anomalies queue	0,172	0,118	0,103	0,064
Total anomalies tete	0,113	-0,211	-0,160	-0,202
Total anomalies pieces intermediaires	-0,079	-0,049	0,010	0,017

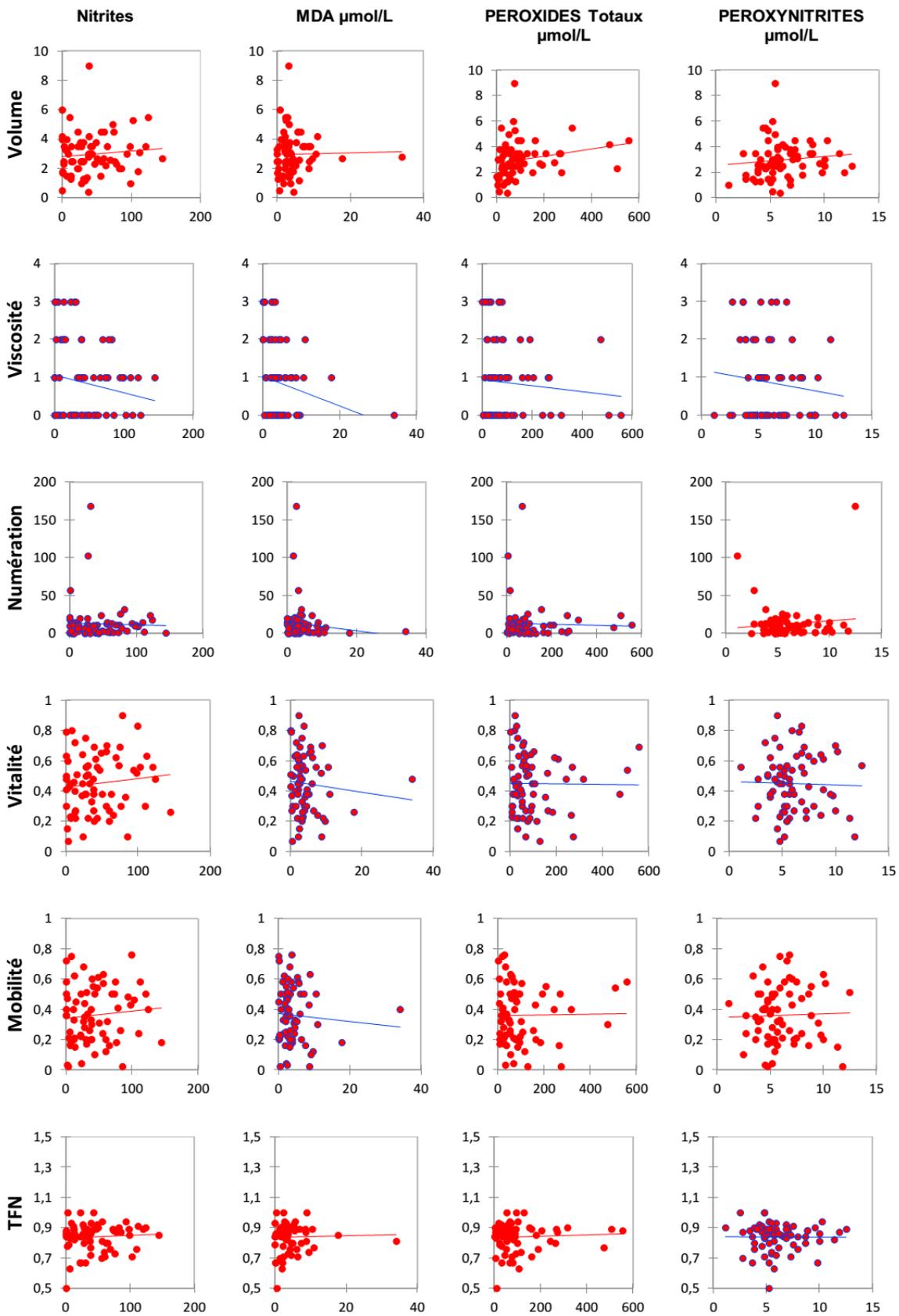


Figure 64: Régression linéaire entre les marqueurs oxydant et les paramètres du sperme

Tableau LVI: Corrélation des marqueurs oxydants par le fructose, la FSH et l’Inhibine B.

<i>Variables</i>	<i>Nitrites</i>	<i>MDA</i>	<i>Peroxides Totaux</i>	<i>Peroxynitrites</i>
Concentration FSH	0,002	0,099	-0,112	-0,200
Concentration Inhibine B	-0,273**	-0,282**	-0,072	0,082
Concentration Fructose	0,131	0,208	0,465**	0,137

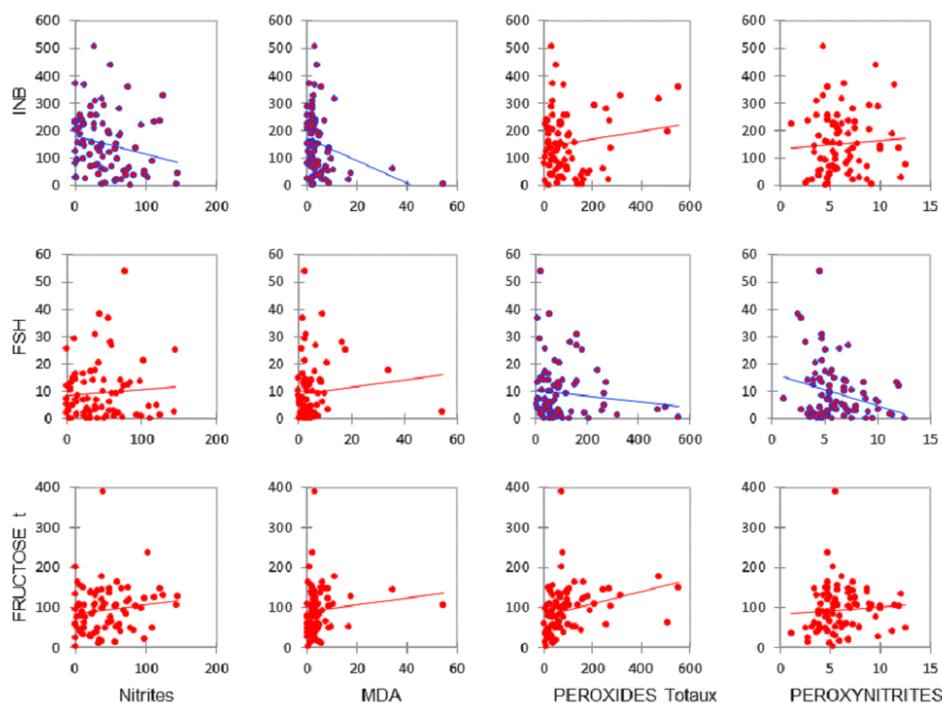


Figure 65: Régression linéaire entre les marqueurs oxydants et le fructose, la FSH et l’Inhibine B.

III.4 Discussion

L'infertilité masculine connaît actuellement une véritable explosion épidémique touchant plus les pays en voie de développement comme le Cameroun (Momo et *al.*, 2019). Les projections pour les prochaines décennies sont alarmantes. A ce jour, il existe de nombreux facteurs qui affectent la fertilité d'une population, directement ou indirectement. L'objectif de la première partie de cette étude était de caractériser les facteurs déterminants de l'infertilité masculine, à travers un échantillon représentatif d'une population, présentant des anomalies du spermogramme dans la ville de Yaoundé.

Notre population d'étude comprenait 52 Normospermiques (groupe de témoins) et 96 présentant au moins une anomalie du spermogramme et consultant pour infertilité (groupe de Cas). Par conséquent, les témoins représentaient la moitié de la taille des Cas. Cette taille d'échantillon était semblable à de nombreuses études telles que Atig et *al.*, (2017) en Tunisie, Eroglu et *al.*, (2014) en Turquie, Mostafa et *al.*, (2014) en Egypte, Mehrotra et *al.*, (2013) en Inde, et Tang et *al.*, (2011) en Chine. Dans notre cas, le groupe témoin a été le plus difficile à convaincre de participer à l'étude.

Nous avons relevé que 55% de nos participants souffraient d'infertilité secondaire et 45% d'infertilité primaire. Dans une étude réalisée en 2017 par Nahla al-Bayyari, il a identifié 69,2% des participants ayant au moins un enfant. De même, Leke et *al.* (2011), avaient trouvé une prévalence de 60% d'infertilité secondaire. En effet, les patients ayant déjà au moins un enfant, étaient convaincus de ne pas être la cause de l'infertilité du couple, et donc plus disposés à venir en consultation et à faire les examens biologiques.

La classe d'âge majoritaire était celle de 30 à 35 ans. Mahboubi et *al.*, en 2014, ainsi qu'Alejandro et *al.*, en 2001 ont trouvé des groupes d'âge similaires. Ceci s'explique par le fait que c'est l'âge auquel les hommes ressentent plus le besoin de fonder une famille. Le groupe des Cas était plus âgé que celui des témoins, mais sans différence significative. Plus encore, les patients souffrant d'infertilité secondaire (Cas 2) étaient plus âgés que ceux consultants pour infertilité primaire (Cas 1) et avaient également une durée d'infertilité plus longue. L'âge avancé de nos patients peut s'expliquer par le retard de la consultation du fait du mythe de la seule responsabilité féminine dans l'infertilité du couple. Plus particulièrement, les Cas 2 étant convaincus de leur fertilité, ils avaient tendance à prendre d'autres épouses, retardant ainsi les échéances pour une éventuelle consultation. Ces résultats corroborent ceux d'Atig et *al.*, (2017) en Tunisie, El-Taieb et *al.*, (2015) en Egypte, Kullisaar

et *al.*, (2013) en Estonie, Mehrotra et *al.*, (2013) en Inde, Bénédiotti et *al.*, (2012) en Italie, Gao et *al.*, (2012) en Chine et Shamsi et *al.*, (2012) en Inde.

L'indice de masse corporelle moyen des Cas était supérieur à celui des témoins (soit $26,754 \pm 3,823 \text{ Kg/m}^2$ et $25,983 \pm 3,414 \text{ Kg/m}^2$ respectivement). La majorité de nos patients (63%) avait un IMC d'au moins 25 Kg/m^2 et de plus nous avons retrouvé des patients d'obésité de type II dans le groupe des Cas. Nos résultats corroborent ceux d'Alejandro et *al.* (2001) et pourraient s'expliquer par le fait que la plupart de nos patients menaient une vie assez sédentaire de par leur profession. En effet, la majorité des participants étaient des fonctionnaires, des chauffeurs, des techniciens et des commerçants. Une corrélation positive et significative a été observée entre l'IMC et l'âge. Raad et *al.* (2017) ont également observé cette association. Un rapport de l'OMS (2018) a noté que l'IMC a augmenté de 1 kg/m^2 par décennie jusqu'à l'âge de 50, ce qui s'explique par une diminution progressive du métabolisme de base, elle-même liée à une diminution de la masse musculaire avec l'âge.

Plus de 85% des professions de nos patients présentaient une faible exposition aux toxiques. En effet, les professions dominantes étaient celles de fonctionnaire, chauffeur, commerçant, et enseignant. Nos résultats diffèrent de ceux d'Alejandro et *al.* (2001) en Argentine, où ils ont ciblé les agriculteurs en particulier qui étaient en contact avec des substances toxiques telles que les pesticides. D'autre part, nos résultats sont proches de ceux de Momo et *al.* (2019) à Dschang (Cameroun) qui avaient également observé une prédominance d'enseignants et de commerçants. Dans leur étude, agriculteurs et chauffeurs étaient les professions les moins fréquentes mais présentaient les proportions les plus élevées d'anomalies du spermogramme.

Les principaux antécédents cliniques prédisposant notre population étaient la cryptorchidie, les oreillons, la varicelle, la varicocèle, une chirurgie abdominale/pelvienne et l'ablation d'un testicule ($OR > 1$). Mahboubi et *al.*, (2014) en Iran ont identifié dans leur population la varicocèle et la hernie comme les principaux facteurs biologiques prédisposant à l'infertilité. Ceci s'explique par le fait que dans leur étude, la majorité des hommes infertiles étaient des ouvriers manuels qui effectuaient des activités physiquement exigeantes.

S'agissant des comportements à risque et des habitudes alimentaires, les plus prédisposant pour l'infertilité étaient le téléphone dans la poche du pantalon, l'utilisation de l'ordinateur sur les genoux, le port de vêtements serrés, la grande consommation de Fast-Foods, de sucreries et d'aliments gras. Nahla al-Bayyari (2017) a observé que 63,5% des patients gardaient leurs téléphones dans leurs poches cependant, ils n'ont pas obtenu une association

significative entre la diminution significative de la qualité du sperme et l'utilisation du téléphone. L'alimentation et la nutrition jouent un rôle important dans la qualité du sperme (Durairajanayagam et *al.*, 2018). Un récent examen systématique complet des études observationnelles a conclu que l'apport d'une alimentation saine et équilibrée pourrait améliorer les taux de qualité de sperme et de fécondité (Salas-Huetos, 2017). Une autre étude a défini une diète typique de style occidental, ainsi que des boissons énergisantes, tandis que le régime alimentaire « prudent » se compose principalement de viande blanche, de fruits, de légumes et de grains entiers. Le régime sain « prudent » était positivement associé à la mobilité progressive du sperme, mais pas à la concentration et à la morphologie du sperme (Gaskins, 2012). Les légumes et les fruits, le poisson et la volaille, les céréales et les produits laitiers à faible teneur en gras ont été positivement associés à la qualité du sperme. Cependant, les régimes de viande transformée, de produits laitiers riches en graisses, d'alcool, de café et de boissons sucrées ont été associés à des taux de fécondité médiocre (Salas-Huetos, 2017). L'alcool et la cigarette n'ont pas été identifiés comme facteur de risque dans notre étude. En fait, nos patients consommaient en moyenne une seule bouteille d'alcool par semaine, buvaient en moyenne $1,47 \pm 0,8$ litres d'eau par jour et étaient, en général des non-fumeurs.

Exception faite de l'infection à Chamydiae, la fréquence des infections du système reproducteur mâle étaient assez faible. Mesbah et *al.*, l'ont relevé et l'explique par le fait que plus de précaution et de mesures d'hygiène sont adoptées au fil du temps avec l'émergence des MST et du VIH, entraînant une baisse significative de la prévalence des infections du tractus génital.

Après avoir identifié les facteurs déterminants, l'objectif de la deuxième partie était non seulement de déterminer la fréquence des anomalies spermatiques mais aussi de corrélérer ces anomalies aux facteurs mentionnés plus haut.

De même que de nombreuses études (Hensen et *al.*, 2018 ; Comar et *al.*, 2017), nous avons observé que la durée d'abstinence était négativement corrélée à la viscosité et le pH, et positivement corrélée au volume, à la concentration en spermatozoïdes, la vitalité, la mobilité, et le pourcentage de formes normales. L'étude de Comar et *al.* a montré que la concentration de sperme dans une plus grande période abstinence était considérablement plus élevée, ce qui peut être attribué au fait que des réserves étaient disponibles et stockées dans l'épididyme. Lors d'une période d'abstinence plus courte, les réserves sont épuisées et le nombre total de spermatozoïdes diminue.

Les résultats de spermoculture montrent qu'aucune bactérie pathogène n'avait été retrouvée dans le sperme des patients. Mesbah et *al.*, en 2016 parlent de 15% d'infections des voies urinaires génitales masculines mais cette prévalence inclue toutes causes confondues. Un rapport de Raymond (2013) montre que dans une étude menée dans le Groupe Hospitalier Cochin Saint Vincent de Paul en 2010 incluant 1490 patients, la spermoculture n'a permis d'observer que 9,5% de culture significative mono-microbienne ou poly-microbienne avec dominance d'un seul germe. Cette faible prévalence des spermocultures positives serait due au fait que le plasma séminal contient des substances bactéricides de telle sorte que certaines bactéries quand bien même présentes dans l'éjaculat, ne pourront être détectées par les méthodes d'analyse de routine (Keck et *al.*, 1998).

La majorité des patients avaient un âge avancé de paternité (> 35 ans). En outre, l'âge était négativement corrélé au volume, à la numération des spermatozoïdes, à la vitalité et la à mobilité et positivement corrélée à la viscosité, au pH et au pourcentage de formes normales. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que lorsque les hommes vieillissent, la fonction testiculaire et le métabolisme se détériorent. En effet, les testicules subissent des changements morphologiques liés à l'âge tels que la diminution du nombre de cellules germinales, des cellules de Leydig et de Sertoli, ainsi que des changements structurels, y compris le rétrécissement de tubules séminifères (Durairajanayagam et *al.*, 2018 ; Gunes, 2016).

Exception faite de la numération des spermatozoïdes qui diminuait avec l'IMC, l'IMC était positivement corrélé au volume, à la viscosité, au pH, à la vitalité, à la mobilité et au pourcentage de formes normales. Raad et *al.*, en 2017 suggèrent que le surpoids et l'obésité chez les hommes sont associés à une incidence élevée d'oligozoospermie et d'azoospermie (Raad et *al.*, 2017; Neto et *al.*, 2016), une réduction du pourcentage de morphologie normale du sperme (Campbell et *al.*, 2015; Macdonald et *al.*, 2013). La même étude souligne l'impact négatif de l'obésité sur la survie et la différenciation du spermatozoïde.

Les Cas avaient des valeurs plus faibles concernant le volume, la concentration en spermatozoïdes, le nombre total de spermatozoïdes, la mobilité progressive, la vitalité et le pourcentage total de formes normales. Ils avaient des valeurs plus élevées du pH et de la viscosité. Ces résultats confirment l'implication des anomalies spermatiques dans l'infertilité.

Les Cas 1 ont présenté des valeurs supérieures du pH, de la concentration en spermatozoïdes, de vitalité et du pourcentage de formes normales comparé au Cas 2. Ceci peut s'expliquer par le fait que les Cas1 étaient en moyenne plus jeunes que les Cas 2.

Les anomalies du nombre étaient plus prépondérantes, suivies des anomalies de la vitalité, puis des anomalies de la mobilité, et des anomalies du volume. Environ 67% des Cas cumulaient plusieurs anomalies spermatiques et l'association la plus fréquente était la combinaison Oligospermie + Asthénospermie + Nécospermie. Ces résultats corroborent ceux de Öztekin et al. (2019) qui avaient également trouvé 68% d'association d'anomalies dans leur population.

Les antécédents cliniques (plus précisément la cryptorchidie, les oreillons, la varicelle et la varicocèle), chirurgicaux, la profession, les comportements à risque (plus précisément, la consommation d'alcool, le port du téléphone dans la poche et le port de vêtements serrés) présentaient un facteur de risque plus important pour une baisse de la numération. Öztekin et al. (2019) ont également démontré l'implication de la varicocèle dans la baisse de la qualité du sperme. Wong et al., en 2004 ont montré que le *Chlamydia trachomatis* affectent les deux sexes mais a un impact beaucoup plus important sur les femmes que sur les hommes. Chez ces derniers, les infections à chlamydia peuvent rester silencieuses (Mesbah et al., 2016).

La troisième partie de notre étude visait à identifier les troubles des marqueurs biochimiques liés à ces anomalies.

Le fructose est le substrat glycolysable majeur du plasma séminal et est largement accepté comme marqueur de la fonction des vésicules séminales. Comparé aux témoins, la population de Cas avait un taux significativement supérieur de fructose. Nos résultats révèlent également une corrélation positive entre le fructose et le volume, le pH, le pourcentage total de formes normales, la vitalité et la mobilité et une corrélation négative entre le fructose et la numération des spermatozoïdes et la viscosité. Nos résultats sont semblables à ceux de Nguyen et al., 2018 qui ont trouvé des valeurs plus faibles de fructose chez les patients normospermiques. Ils affirment que plus la concentration en spermatozoïde est élevée, la vitalité et la mobilité requièrent plus d'énergie, de sorte que le fructose diminue. Ainsi donc, chez nos patients, les anomalies du spermogramme ne sont pas dues à un déficit en fructose mais pourraient être un indicateur de la baisse de la concentration en spermatozoïdes.

Dans notre population, la corrélation entre les hormones et les tranches d'âge montre que l'Inhibine B diminuait avec l'âge et inversement, la FSH augmentait avec l'âge. De même, Wagner, en 2004 a noté qu'avec l'âge, on observe une augmentation de la FSH et une diminution de l'Inhibine B plasmatiques. Les dosages spécifiques montrent que les taux d'Inhibine B des hommes de plus de 60 ans sont la moitié de ceux des hommes jeunes. L'augmentation de la concentration plasmatique de FSH et la diminution de la concentration

circulante d'inhibine B chez les sujets âgés sont en faveur d'une altération de la fonction des cellules de Sertoli, avec libération du rétrocontrôle sur la sécrétion de FSH (Wagner, 2004).

De même, l'Inhibine B diminuait significativement avec l'IMC et inversement, la FSH augmentait avec l'IMC. Il a été démontré que les hormones impliquées dans la régulation de la spermatogenèse (FSH) et sécrétées par les cellules de Sertoli (inhibine B) étaient plus faibles chez les hommes obèses comparativement aux personnes non obèses (McPherson et al., 2015; Michalakis et al., 2013; Sermondade et al., 2013). De plus, l'obésité peut altérer le métabolisme cellulaire des cellules de Sertoli affectant ainsi les cellules germinales (McPherson et al., 2015; Michalakis et al., 2013; Sermondade et al., 2013).

Chez les hommes, l'inhibine B est sécrétée dans le testicule comme produit des cellules de Sertoli impliquées dans la régulation de la sécrétion de FSH (Von Eckardstein et al., 1999). Nous avons trouvé une corrélation significative et négative entre la FSH et l'Inhibine B dans notre population. Ceci corrobore très bien les résultats de Barbotin et al. (2015), Von Eckardstein et al. (1999) et Jensen et al. (1997), indiquant que la FSH et l'inhibine B sont des outils complémentaires dans les conditions masculines gonadales et le diagnostic andrologique (Barbotin et al., 2015). Plus encore, la FSH et l'inhibine B ensemble sont plus sensibles que l'un ou l'autre seul dans la prévoyance du statut histologique du testicule et la présence de spermatozoïdes dans le tissu bioptique (Barbotin et al., 2015).

L'inhibine B était positivement corrélée au pourcentage de formes normales, la concentration en spermatozoïdes et au volume et négativement corrélée à la vitalité, la mobilité, la viscosité et le pH. La FSH quant à elle était positivement corrélée au Pourcentage de formes normales, au volume et au pH ; elle était négativement corrélée à la vitalité, la mobilité, la numération et la viscosité. Ces résultats corroborent ceux de Grunewald et al. en 2013, Jorgensen et al. en 2010, Myers et al. en 2008, Kumanov et al. en 2006, et Sikaris et al. en 2005. En outre, Barbotin et al. ont expliqué que les associations entre ces hormones et la numération des spermatozoïdes sont plus fortes dans les études de la population générale (Uhler et al., 2003; Jensen et al., 1997) des hommes infertiles (Myers et al., 2008; Meecker et al., 2007; Kumanov et al., 2006; Pierik et al., 2003) par rapport aux études sur les hommes fertiles (Jorgensen et al., 2010; Myers et al., 2008). Ils précisent qu'il pourrait être dû aux différences interindividuelles marquées lors de la numération des spermatozoïdes des hommes principalement normozoospermiques. Au total, les catégories d'hommes (fertiles, stériles et normozoospermiques) présentaient un chevauchement dans les qualités de sperme, ce qui suggère que l'inhibine B et la FSH n'étaient pas principalement des marqueurs de fertilité,

mais plutôt des marqueurs de la qualité du sperme et donc de la fécondité. En outre, Il a été suggéré que l'inhibine B peut être un meilleur prédicteur de la spermatogénèse que la FSH (Von Eckardstein et *al.*, 1999). La valeur clinique de l'analyse de l'inhibine B est soulignée par le fait que, contrairement à la FSH, l'inhibine B est produite à l'intérieur du testicule et pourrait refléter des interactions étroites entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales (Von Eckardstein et *al.*, 1999). Ainsi, les niveaux d'inhibine B sont directement corrélés avec la spermatogénèse et reflètent la production de spermatozoïdes testiculaires.

La distribution des marqueurs du stress oxydatif au sein de la population indique que les Cas avaient des concentrations plus faibles de Catalase, Glutathion réduit et Glutathion peroxydase comparé aux témoins. Exception faite des peroxy-nitrites, les concentrations en peroxydes totaux, MDA, et nitrites étaient plus élevées dans le groupe de Cas comparé aux témoins. Nos résultats corroborent ceux de Chao Huang et *al.*, 2018, Fukai et *al.*, 2011 et Bhabak et *al.*, 2010. Les nombreuses méta-analyses qu'ils ont réalisé indiquent que plusieurs marqueurs du stress oxydatif sont perturbés dans le plasma sérial des hommes avec infertiles, indiquant que ceux-ci pourraient être associés à infertilité masculine.

La corrélation des marqueurs antioxydants par l'âge nous montre qu'excepté la Glutathion peroxydase et la vitamine E, La Catalase, la SOD, le Glutathion réduit et la FRAP étaient négativement corrélés à l'âge. Au contraire, les marqueurs oxydants étaient positivement corrélés à l'âge (sauf les peroxy-nitrites). En abondant dans notre sens, Liguori et *al.*, en 2018, ont discuté du stress oxydatif et de la théorie du vieillissement. Ils suggèrent que les pertes fonctionnelles associées à l'âge sont dues à l'accumulation de dommages oxydatifs aux macromolécules (lipides, ADN et protéines) par les ERO. En outre, les niveaux accrus de ERO conduisent à la sénescence cellulaire, un mécanisme physiologique qui arrête la prolifération cellulaire en réponse aux dommages qui surviennent pendant la réplication. Les cellules sénescents acquièrent un phénotype sécrétoire (SASP) irréversible associé à la sénescence impliquant la sécrétion de facteurs solubles (interleukins, chemokines et facteurs de croissance), des enzymes dégradantes comme les métalloprotéases matricielles (MMPs) et les composantes des protéines/matrice extracellulaire (ECM) (pôle et *al.*, 2016; Chandrasekaran et *al.*, 2017).

L'IMC était positivement corrélée au Glutathion peroxydase, la vitamine E et le Glutathion réduit et négativement corrélée à la SOD, la Catalase, et la FRAP. Les marqueurs oxydants étaient tous positivement corrélés à l'IMC. Nos résultats sont semblables à ceux de Karma et *al.*, en 2019 qui ont montré qu'il existe une relation entre l'IMC et le stress oxydatif. En effet,

l'augmentation de l'adiposité entraîne une augmentation de la cible des ERO que sont les lipides polyinsaturés.

De façon générale, nos résultats ont montré une corrélation positive entre les marqueurs antioxydants et les paramètres du sperme et inversement une corrélation négative entre les marqueurs oxydants et les paramètres du sperme (particulièrement MDA et peroxydes totaux). Nos résultats ont également que certains marqueurs antioxydants seraient positivement liés à des anomalies du sperme tels que la vitamine E, la SOD et la catalase ; inversement, certains marqueurs oxydants seraient positivement liés à la numération, la mobilité, la vitalité et le volume. Khosrowbeygi et *al.*, en 2007 et Mehraban et *al.*, en 2005 n'ont observé aucune corrélation entre les niveaux de SOD et de NO avec les paramètres séminaux, mais ils ont constaté que les niveaux capacité antioxydante totale était corrélée positivement avec la motilité et la morphologie des spermatozoïdes. Ils ont également observé une corrélation entre l'activité catalase et concentration de sperme, la mobilité, et la morphologie des spermatozoïdes. La notion de paradoxe antioxydant décrit comment les antioxydants peuvent exacerber les blessures par une perte de mécanismes oxydatifs, la promotion de lésions tissulaires, et une augmentation paradoxale d'ERO (Halliwell et *al.*, 2000). Comme discuté précédemment, l'oxydation joue un rôle nécessaire dans la reproduction masculine et la supplémentation antioxydante non réglementée peut inhiber ces mécanismes. Le surplus de CAT peut prévenir la capacitation en inhibant l'oxydation locale (Aitken et *al.*, 1995). De même, l'excès de SOD et de CAT peut empêcher la réaction de l'acrosome de se produire (Lamirande et *al.*, 1998).



**Conclusion et
Perspectives**

1. Conclusion

Parvenu au terme de cette étude dont l'objectif principal était de rechercher les anomalies spermatiques responsables des infertilités masculines à Yaoundé et leurs étiologies épidémiologiques et biochimiques nous notons une forte prévalence de l'infertilité masculine (62%) dans notre population se traduisant une prépondérance d'anomalies du nombre (82%), suivi des anomalies de la vitalité (78%), des anomalies de la mobilité (59%), et des anomalies du volume (12,4%).

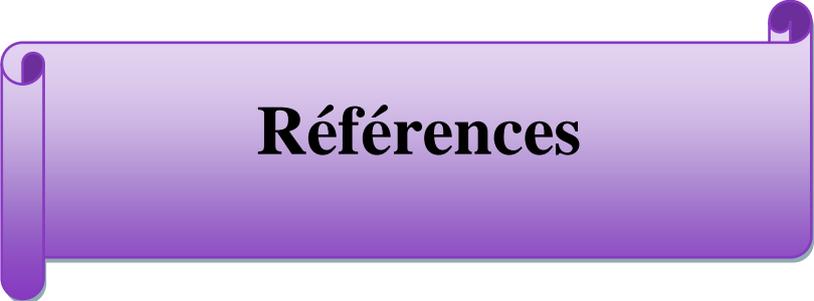
Notre étude nous a permis de constater que cette augmentation de la fréquence de l'infertilité est la conséquence d'un changement radical dans le mode de vie constaté chez les citoyens, où les habitudes alimentaires observées étaient marquées par une consommation élevée Fast-Foods, de sucreries et d'aliments gras. D'autres déterminants étaient l'âge paternel avancé, l'obésité, la durée d'abstinence, la cryptorchidie, les oreillons, la varicelle, la varicocèle, une chirurgie abdominale/pelvienne et l'ablation d'un testicule, mais aussi le téléphone dans la poche du pantalon, l'utilisation de l'ordinateur sur les genoux, et le port de vêtements serrés.

S'agissant des marqueurs biochimiques, la concentration de fructose était plus faible dans le groupe témoin comparé aux Cas. L'inhibine B était plus faible dans le groupe des Cas et elle était négativement corrélée à la FSH. De plus, on observait une corrélation significative entre l'inhibine B, la FSH et les paramètres du sperme. L'infertilité était également associée à un état de stress oxydant marqué par un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par rapport aux systèmes de défense antioxydants. Dans notre étude, l'évaluation des différents marqueurs du stress oxydatif indique que le groupe de Cas avaient des concentrations plus faibles en antioxydants et plus élevées en pro-oxydants comparé au groupe de témoins. De plus, nous avons vu que les paramètres du sperme étaient corrélés au marqueurs antioxydants et oxydants et que la supplémentation non réglementée peut conduire à une abondance pathologique d'antioxydants causant un déséquilibre entre l'oxydation et la réduction.

2. Perspectives

Nous nous proposons de :

- Mener une étude de cohorte afin d'évaluer la réversibilité de la perturbation des paramètres du sperme grâce à un suivi médical effectif, une alimentation équilibrée, un traitement adéquat des infections, une supplémentation réglée en antioxydants et la mise en place de bonnes attitudes et habitudes.



Références

- Acharya UR, Acharya S, Mishra M. Lead acetate induced cytotoxicity in male germinal cells of Swiss mice. *Industrial health* 2003; 41(3):291-4.
- Adams JA, Galloway TS, Mondal D, Esteves SC, Mathews F. Effect of mobile telephones on sperm quality: a systematic review and meta-analysis. *Environ Int* 2014; 70:106–12.
- Afeiche MC, Gaskins AJ, Williams PL, Toth TL, Wright DL, Tanrikut C, et al. Processed meat intake is unfavorably and fish intake favorably associated with semen quality indicators among men attending a fertility clinic. *Journal of Nutrition*. 2014; 144:1091–8.
- Agarwal A, Durairajanayagam D. Are men talking their reproductive health away? *Asian Journal of Andrology*. 2015; 17:433–4.
- Agarwal A, et al. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2015; 13:37.
- Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American Journal of Reproductive Immunology* 2008; 59:2–11.
- Agarwal A, Mulgund A, Sharma R, Sabanegh E. Mechanisms of oligozoospermia: an oxidative stress perspective. *Systems Biology Reproductive Medicine*. 2014; 60:206–16.
- Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S. What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology*. 2006; 67:2–8.
- Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian Journal of Experimental Biol*. 2005; 43: 963-974.
- Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ Jr, Alvarez JG, Sikka SC. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertility and Sterility* .2006; 86:878–885.
- Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World Journal of Men's Health* 2014; 32:1–17.
- Aitken R, Paterson M, Fisher H, Buckingham D, Van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal of Cell Sciences*. 1995; 108:2017–25.
- Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006; 250:66–69.

- Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*. 1995; 7:659–68.
- Alejandro O, Spira A and Multigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reproduction* Vol.16, No.8 pp.1768-1776, 2001.
- Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervanciog̃lu E, Ozveri H, Yalc, in S, et al. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *Journal of Urology*.1997; 157:140–3.
- Alleva R, Scaramucci A, Mantero F, Bompadre S, Leoni L, Littarru G. The protective role of ubiquinol-10 against formation of lipid hydroperoxides in human seminal fluid. *Molecular Aspects of Medicine*. 1997; 18 (Suppl.):221–8.
- Alshahrani S, McGill J, Agarwal A (2013). Prostatitis and male infertility. *Reproductive Immunology* 100: 30-36.
- Alvarenga TA, Hirotsu C, Mazaro-Costa R, Tufik S, Andersen ML. Impairment of male reproductive function after sleep deprivation. *Fertility and Sterility* .2015; 103:1355–62, e1.
- American Urological Association. The evaluation of the azoospermic male: *AUA best practice statement*. 2011 (<https://www.auanet.org/common/pdf/education/clinical-guidance/Male-Infertility-b.pdf>).
- Anawalt BD. Approach to male infertility and induction of spermatogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2013 98:3532–3542. (doi:10.1210/jc.2012-2400)
- Anderson AM. Inhibin B in the assessment of seminiferous tubular function. *Balliere Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metablism*. 2000; 14:389–97.
- Anderson RA, Sharpe RM. Regulation of inhibin production in the human male and its clinical applications. *International Journal of Andrology* 2000; 23:136–44.
- Atig F, Kerkeni A, Saad A, Ajina M. Effects of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2017; 34:373–381
- Atlas of Sperm Morphology: Marilyn Marx Adelman, Eileen M.Cahill, ASCP Press, Chicago, 1989.
- Auroux J. Infections urogénitales et fertilité masculine. *Journal of Gynécology Obstetrics and Biological Reproduction*. 1988; 17.
- Auroux M. IST et fertilité masculine. *Les Nouvelles Dermatologiques*.1989 ; 8 : 257-9.

- Autilio C, Morelli R, Milardi D, Grande G, Marana R, et al. (2015) soluble urokinase-type plasminogen activator receptor as a putative marker of male accessory gland inflammation. *Andrology* 3: 1054-1061.
- Ayad Faeq Palani and Nora Sabah Asdallh. Low Seminal Plasma Antioxidant Potential Effects Semen Quality and Reduces Male Fertility. Available online at www.garmian.edu.krd Passer Journal Passer 1 (2019) 04-08
- Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine Interantional*. 2010.
- Barbotin A-L, Ballot C, Sigala J, Ramdane N, Duhamel A, Marcelli F, Rigot J-M, Dewailly D, Pigny P, and Mitchell V. The serum inhibin B concentration and reference ranges in normozoospermia. *European Journal of Endocrinology*. 2015 172, 669–676.
- Bauche F, Fouchard M-H, Je'gou B. Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Letter*. 1994; 349:392–6.
- Beal MA, Yauk CL, Marchetti F. From sperm to offspring: Assessing the heritable genetic consequences of paternal smoking and potential public health impacts. *Mutation Research*. 2017; 773:26–50.
- Belloc S, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, Amar E, Hazout A, de Mouzon J. Caffeine intake and sperm parameters. Analysis of a cohort of 4474 consecutive semen samples. *Fertility and Sterility*. 2013; 100 (Suppl.):S212.
- Belloc S, Hazout A, Zini A, Merviel P, Cabry R, Chahine H, et al. How to overcome male infertility after 40: Influence of paternal age on fertility. *Maturitas*. 2014; 78:22–9.
- Benedetti S, Tagliamonte MC, Catalani S, Primiterra M, Canestrari FS, Stefani D, Palini S, Bulletti C. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reproductive biomedicine online*. 2012; 25:300–306
- Benoff S, Auburn K, Marmar JL, Hurley IR. Link between low dose environmentally relevant cadmium exposures and asthenozoospermia in a rat model. *Fertility and Sterility* 2008; 89 (2 Suppl):e73-9.
- Benzie F, Strain J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analalytical Biochemistry*. 1996; 239:70–6
- Bhabak KP, Mugesh G. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. *Accounts of chemical research*. 2010; 43:1408–1419.

- Bhende AA and Kanitkar T. Principles of Population Studies, *Himalayan Publishing House*, 2008.
- Bieniek JM, Drabovich AP, Lo KC. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. *Asian Journal of Andrology*. 2016; 18 (3):426±33.<https://doi.org/10.4103/1008-682X.175781> PMID:26975492; PubMed Central PMCID: PMC4854096.
- Bio-Rad. PLATELIA™ CHLAMYDIA IGG TMB 62767. Détection des IgG anti-chlamydia dans le sérum humain par méthode immuno-enzymatique. 2006
- Bio-Rad. SIR MYCOPLASMA 62781. Antibiogramme des mycoplasmes uro-génitaux. 2007
- Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*. 2017; 14:470–85.
- Boehm U, et al. Expert consensus document: European consensus statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism-pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Urology* 2015; 11: 547-64.
- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*. 2007 Jun; 22 (6):1506-12. Epub 2007 Mar 21. Erratum in: *Human Reproduction*. 2007 Oct; 22 (10):2800.
- Bonde JP. Occupational causes of male infertility. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity*. 2013;20:234–9.
- Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemistry Journal* 1973; 134:707–16.
- Braga DP, Halpern G, Figueira Rde C, Setti AS, Iaconelli Jr A, Borges Jr E. Food intake and social habits in male patients and its relationship to intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertility and Sterility*. 2012; 97:53–9.
- Bry-Gauillard H, et al. Mitotane for 21-hydroxylase deficiency in an infertile man. *New England Journal of Medicine*. 2014; 371:2042.
- Burger HG, Igarashi M. Inhibin: Definition and nomenclature, including related substances. *Endocrinology* 1988; 122:1701–2.
- Campbell JM, Lane M, Owens JA, Bakos HW. Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biomedicine Online*. 2015; 31:593–604.

- Campbell JM, Lane M, Owens JA, Bakos HW. Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biomedicine Online*. 2015; 31:593–604.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkeblek EN. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years (1992). *British Medical Journal*. Volume 305; <https://doi.org/10.1136/bmj.305.6854.609>
- Carne CA, Chilcott S, Palmer C, Green O, Bridge S, Walsh R, et al. Low sperm counts in genitourinary medicine clinic attendees: results from a case-control study. *Sexually Transmitted Infection* 2012; 88: 422-6.
- Carter SD, Hess RA, Laskey JW. The fungicide methyl 2-benzimidazole carbamate causes infertility in male Sprague-Dawley rats. *Biology of Reproduction* 1987; 37(3):709-17.
- Cengiz T, Aydoganli L, Baykam M, Mungan NA, Tuncbilek E, Dincer M, et al. Chlamydial infections and male infertility. *International Urology and Nephrology* 1997; 29:687-93.
- Centers for Disease Control and Prevention (US) National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health (US). How tobacco smoke causes disease: the biology and behavioral basis for smoking attributable disease: a report of the Surgeon General Publications and Reports of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2010.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2010 sexually transmitted diseases surveillance Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; [cited 2013 Jan 30]. Available from: <http://www.cdc.gov/std/stats10/syphilis.htm>.
- Chandrasekaran A, Idelchik MDPS, Melendez JA. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biology*. 2017; 11:91–102.
- Chao Huang, Xiyue Cao, Dejiang Pang, Chao Li, Qihui Luo, Yuanfeng Zou, Bin Feng, Lixia Li , Anchun Cheng and Zhengli Chen. Is male infertility associated with increased oxidative stress in seminal plasma? A-meta analysis. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, (No. 36), pp: 24494-24513
- Chaudhari AR, Piyali Das, Ramji Singh. Study of oxidative stress and reduced glutathione levels in seminal plasma of human subjects with different fertility potential. *Biomedical Research* 2008; 19 (3): 207-210

- Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertility and Sterility*. 2010; 93:2222–31.
- Chen H, Chow PH, Cheng SK, Cheung AL, Cheng LY. Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *Journal of Andrology* 2003; 24:704–11.
- Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* 2003; 185(1-2):119-27.
- Chitra KC, Sujatha R, Latchoumycandane C, Mathur PP. Effect of lindane on antioxidant enzymes in epididymis and epididymal sperm of adult rats. *Asian Journal of Andrology* 2001; 3(3):205-8.
- Choi JH, Ryan LM, Cramer DW, Hornstein MD, Missmer SA. Effects of caffeine consumption by women and men on the outcome of in vitro fertilization. *Journal of Caffeine Research*. 2011; 1:29–34.
- Christiansen E, Tollefsrud A, Purvis K. Sperm quality in men with chronic a bacterial prostatovesiculitis verified by rectal ultrasonography. *Urology* 1991; 38:545-9.
- Claire Brookings, David Goldmeier, Hossein Sadeghi-Nejad. Sexually Transmitted Infections and Sexual Function in Relation to Male Fertility. www.kjurology.org
<http://dx.doi.org/10.4111/kju.2013.54.3.149>
- Colagar AH, Marzony ET, Chaichi MJ (2009) Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutrition Research* 29:82–8
- Comar VA, Petersen CG, Mauri1 AL, Mattila M, Vagnini LD, Renzi A, Petersen B, Nicoletti A, Dieamant F, Oliveira JBA, Baruffi RLR, Franco JGJr. Influence of the abstinence period on human sperm quality: analysis of 2,458 semen samples. *JBRA Assisted Reproduction* 2017;21(4):306-312 doi: 10.5935/1518-0557.20170052
- Comhaire F, Mahmoud À. Facteurs masculins des troubles de la fécondité. Approche basée sur le consensus du diagnostic et de la prise en charge standardisée de l'homme infécond. 1998 I-3-1-280.
- Comhaire FH, Rowe PJ, Farley TM. The effect of doxycycline in infertile couples with male accessory gland infection: a double blind prospective study. *International Journal of Andrology*. 1986; 9:91-8.

- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, BakerHWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction*. 2010; 16:231–45.
- Crum-Cianflone NF, Bavaro M, Hale B, Amling C, Truett A, Brandt C, et al. Erectile dysfunction and hypogonadism among men with HIV. *AIDS Patient Care STDS* 2007; 21:9-19.
- Cui X, Jing X, Wu X, Wang Z, Li Q. Potential effect of smoking on semen quality through DNA damage and the downregulation of Chk1 in sperm. *Molecular Medicine Reports*. 2016; 14:753–61.
- Dai JB, Wang ZX, Qiao ZD. The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. *Asian Journal of Andrology* 2015; 17:954–60.
- Damayanthi Durairajanayagam. Lifestyle causes of male infertility. *Arab Journal of Urology* (2018)16, 10–20
- Damayanthi Durairajanayagam. Lifestyle causes of male infertility. *Arab Journal of Urology* (2018)16, 10–20
- Darab Mehraban, Mohammad Ansari, Hossein Keyhan, Mohammadali Sedighi Gilani, Gholamhossein Naderi, Fateme Esfehiani. Comparison of Nitric Oxide Concentration in Seminal Fluid between Infertile Patients with and without Varicocele and Normal Fertile Men. *Urology Journal UNRC/IUA*; Vol. 2, No. 2, 106-110 spring 2005 Printed in IRAN
- David Rizk, Stefan du Plessis, Ashok Agarwal (2013). Environment and Male Fertility. *Chapter 5*.
- De Kretser DM. Male infertility. *Lancet*. 1997 Mar 15; 349 (9054):787-90. Review.
- Depuydt CE, Bosmans E, Zalata A, Schoonjans F, Comhaire FH. The relation between reactive oxygen species and cytokines in andrological patients with or without male accessory gland infection. *Journal of Andrology*. 1996; 17:699–707.
- Desai ID. [1984] Vitamin E methods for animal tissues. *Methods Enzymology* 105: 138–143.
- Desai NR, Kesari KK, Agarwal A. Pathophysiology of cell phone radiation: oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009; 7:114.
- Dinesh V, Shamsi M, Dada R. Supraphysiological free radical levels and their pathogenesis in male infertility. *Reproductive System and Sexual Disorder*. 2012; 1:2.

- Donnelly GP, McClure N, Kennedy MS, Lewis SE. Direct effect of alcohol on the motility and morphology of human spermatozoa. *Andrologia* 1999; 31:43–7.
- Dorostghoal M, Erfani Majd N, Nooraei P. Maternal caffeine consumption has irreversible effects on reproductive parameters and fertility in male offspring rats. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 2012; 39:144–52.
- Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reproductive Biomedicine Online*. 2015; 30:14–27.
- Durairajanayagam D, Sharma R, Du Plessis SS, Agarwal A. Testicular heat stress and sperm quality. In: Du Plessis SS, editor. *Male infertility: a complete guide to lifestyle and environmental factors*. New York: Springer Science + Business Media; 2014.
- Dussault J. Le spermogramme. Séminaire scientifique. Volume 16 • Numéro 2 • Février 2009.
- Eisenberg ML, Kim S, Chen Z, Sundaram R, Schisterman EF, Buck Louis GM. The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study. *Human Reproduction*. 2014; 29:193–200.
- El Hajjami Houssein (2017). Infertilité masculine: profil épidémiologique et clinique (à propos de 123 cas). Thèse de médecine n°195/17.
- El-Taieb MA, Ali MA, Nada EA. Oxidative stress and acrosomal morphology: A cause of infertility in patients with normal semen parameters. *Middle East Fertility Society Journal*. 2015; 20:79–85
- Emanuele MA, Emanuele NV. Alcohol's effects on male reproduction. *Alcohol Health and Research World*. 1998; 22:195–201.
- Eroglu M, Sahin S, Durukan B, Ozakpinar OB, Erdinc N, Turkgeldi L, Sofuoglu K, Karateke A. Blood Serum and Seminal Plasma Selenium, Total Antioxidant Capacity and Coenzyme Q10 Levels in Relation to Semen Parameters in Men with Idiopathic Infertility. *Biological trace element research*. 2014; 159:46–51
- Eskenazi B, Wyrobek AJ, Slotter E, Kidd SA, Moore L, Young S, et al. The association of age and semen quality in healthy men. *Human Reproduction*. 2003;18:447–54.
- EUCAST/CA-SFM. Recommendations. 2019. 1.0.pp.1-9.
- Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-Gonzalez A, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011; 12:3117–32.
- Frank H, Pierik, Jan TM, Vreeburg, Stijnen T, De Jong FH, Androbertus FA, Weber. Serum Inhibin B as a Marker of Spermatogenesis. 2006 jcem.endojournals.org at Medical Library Erasmus MC on December 11.

- Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*. 2011; 15:1583–1606.
- Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosalvez J, Fernandez JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*. *Fertility and Sterility* 2008; 90:328-34.
- Gao Y, Gao Y, Du L, Qin Z, Hu Z. [Zinc, lead, cadmium, malondialdehyde contents and superoxide dismutase activity in serum and seminal plasma in male infertility patients]. [Article in Chinese]. *Journal of Reproductive Medicine*. 2012; 21:43-46.
- Gaskins AJ, Colaci DS, Mendiola J, Swan SH, Chavarro JE. Dietary patterns and semen quality in young men. *Human Reproduction*. 2012; 27:2899–907.
- Gaskins AJ, Colaci DS, Mendiola J, Swan SH, Chavarro JE. Dietary patterns and semen quality in young men. *Human Reproduction*. 2012; 27:2899–907.
- Gaunay G, et al. Reproductive sequelae of diabetes in male patients. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2013; 42:899.
- Gaur DS, Talekar MS, Pathak VP. Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian Journal of Pathological Microbiology*. 2010; 53:35–40.
- Gdoura R, Keskes-Ammar L, Bouzid F, Eb F, Hammami A, Orfila J. *Chlamydia trachomatis* and male infertility in Tunisia. *European Journal of Contraception and Reproduction Health Care*. 2001; 6:102-7.
- Gesler RM. Toxicology of di-2-ethylhexyl phthalate and other phthalic acid ester plasticizers. *Environmental Health Perspectives* 1973; 3:73-9.
- Geva E, Lessing JB, Lerner-Geva L, Amit A. Free radicals, antioxidants and human spermatozoa: clinical implications. *Human Reproduction*. 1998; 13:1422–4.
- Ghorbel M, et al. Chromosomal defects in infertile men with poor semen quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2012; 29:451.
- Giahi L, Mohammadmoradi S, Javidan A, Sadeghi MR. Nutritional modifications in male infertility: a systematic review covering 2 decades. *Nutrition Review*. 2016; 74:118–30.
- Giamarellou H, Tympanidis K, Bitos NA, Leonidas E, Daikos GK. Infertility and chronic prostatitis. *Andrologia* 1984; 16:417-22.

- Gimenes F, Medina FS, Abreu AL, Irie MM, Esquicati IB, et al. (2014) Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR. *PLoS One* 9: e98862.
- Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *Journal of Andrology*. 1996; 17:276–87.
- Griswold MD. Spermatogenesis: The commitment to Meiosis. *Physiology Review* 2016; 96:1-17.
- Grunewald S, Glander H-J, Paasch U & Kratzsch J. Age-dependent inhibin B concentration in relation to FSH and semen sample qualities: a study in 2448 men. *Reproduction*. 2013 145237–244. (Doi: 10.1530/REP-12-0415)
- Gunes S, Hekim GN, Arslan MA, Asci R. Effects of aging on the male reproductive system. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016; 33:441–54.
- Gunyeli I, Abike F, Dunder I, Aslan C, Tapısız OL, Temizkan O, et al. Chlamydia, Mycoplasma and Ureaplasma infections in infertile couples and effects of these infections on fertility. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2011; 283:379-85.
- Gutteridge JMC, Stocks J, Dormandy TL. Thiobarbituric acid-reactive substances derived from autoxidizing linoleic and linolenic acids. *Analytica Chimica Acta*. 1974; 70:107–11
- Hall L, Willimas K, Perry AC, et al (1998). The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochemistry Journal* 333:5–9
- Halliwell B. & Gutteridge JMC. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Second edition, Clarendon, Press, Oxford.
- Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet*. 2000; 355:1179–80.
- Harlev A, Agarwal A, Gunes SO, Shetty A, du Plessis SS. Smoking and male infertility: an evidence-based review. *World Journal of Men's Health*. 2015; 33:143–60.
- Health Protection Agency. Health protection report (weekly report). Volume 6 Number 22. London: Health Protection Agency; 2013. Available from: <http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2012/hpr2212>. Pdf.
- Health Protection Agency. Sexually transmitted infections annual data. London: Health Protection Agency; c2013 [cited Jan 30]. Available from:

<http://www.hpa.org.uk/web/HPAweb&Page&HPAwebAutoListName/Page/1201094610372>.

- Hekimoglu A, Kurcer Z, Aral F, Baba F, Sahna E, Atessahin A. Lycopene, an antioxidant carotenoid, attenuates testicular injury caused by ischemia/reperfusion in rats. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2009; 218:141–7.
- Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian Journal of Andrology*. 2011; 13:43–52.
- Hosseinzadeh S, Brewis IA, Eley A, Pacey AA. Co-incubation of human spermatozoa with *Chlamydia trachomatis* serovar E causes premature sperm death. *Human Reproduction* 2001; 16:293-9.
- Hsu PC, Guo YL. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 2002; 180(1):33-44.
- Huang S, Cui Y, Guo X, Wang L, Li S, et al. (2015) 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether disrupts spermatogenesis, impairs mitochondrial function and induces apoptosis of early leptotene spermatocytes in rats. *Reproductive Toxicology* 51: 114-124.
- Hwang K, Walters RC, Lipshultz LI. Contemporary concepts in the evaluation and management of male infertility. *Nature Reviews Urology*. 2011; 8:86–94.
- Ilaria Liguori, Gennaro Russo, Francesco Curcio, Giulia Bulli, Luisa Aran, David Della-Morte, Gaetano Gargiulo, Gianluca Testa, Francesco Cacciatore, Domenico Bonaduce, Pasquale Abete. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging* 2018;13 757–772.
- Ishihara M, Itoh M, Miyamoto K, Suna S, Takeuchi Y, Takenaka I, et al. Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat. *International Journal of Andrology* 2000;23(2):85-94.
- J. Raymond. La spermoculture. Service de Bactériologie Pr Poyart Groupe Hospitalier Cochin Saint Vincent de Paul. Novembre 2013
- Jacques Young. Infertilité masculine: mécanismes, causes et exploration. Janvier-Février 2016 VOL 80 MCEdwww.mced.fr
- Jayaraman V, Ghosh S, Sengupta A, Srivastava S, Sonawat HM, Narayan PK. Identification of biochemical differences between different forms of male in fertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2014; 31(9):1195±204. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0282-4> PMID:24965760; *PubMed Central* PMCID: PMC4156941.

- Jensen TK, Andersson AM, Hjollund NH, Scheike T, Kolstad H, Giwercman A, Henriksen TB, Ernst E, Bonde JP, Olsen J et al. Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A study of 349 Danish men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997;82:4059–4063. doi:10.1210/jcem.82.12.4456)
- Jensen TK, Swan S, Jorgensen N, Toppari J, Redmon B, Punab M, et al. Alcohol and male reproductive health: a cross-sectional study of 8344 healthy men from Europe and the USA. *Human Reproduction*. 2014; 29:1801–9.
- Jensen TK, Swan SH, Skakkebaek NE, Rasmussen S, Jorgensen N. Caffeine intake and semen quality in a population of 2,554 young Danish men. *American Journal of Epidemiology*. 2010; 171:883–91.
- Jeulin C, Soufir J, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research*. 1989; 24:185–96.
- Johnson SL, Dunleavy J, Gemmell NJ, Nakagawa S. Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Review*. 2015; 19:22–33.
- Joki-Korpela P, Sahrakorpi N, Halttunen M, Surcel HM, Paavonen J, Tiitinen A. The role of Chlamydia trachomatis infection in male infertility. *Fertility and Sterility* 2009; 91(4 Suppl):1448-50.
- Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Human Reproduction*. 2001; 16:1012–9.
- Jorgensen N, Liu F, Andersson AM, Vierula M, Irvine DS, Auger J, Brazil CK, Drobnis EZ, Jensen TK, Jouannet P et al. 2010 Serum inhibin-b in fertile men is strongly correlated with low but not high sperm counts: a coordinated study of 1,797 European and US men. *Fertility and Sterility* 94:2128–2134. (doi:10.1016/j.fertnstert.2009.12.051)
- Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Krausz C, Tournaye H. Guidelines on Male Infertility. *European Association of Urology* 2015.
- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C. European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European association of urology guidelines on male infertility: the 2012 update. *European Urology*. 2012; 62:324–332.

- Jurewicz J, Hanke W, Radwan M, Bonde JP. Environmental factors and semen quality. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 2009; 22(4):305-29.
- Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. Effects of occupational exposure - is there a link between exposure based on an occupational questionnaire and semen quality? *Systems Biology Reproductive Medicine*. 2014; 60:227–33.
- Juyena NS, Stelletta C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology*.2012; 33(4):536±51.<https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012583>PMID:22016346.
- Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sciences* 2004; 74(24):2931-40.
- Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TI, Liao TL, Wei YH. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and Sterility*. 2008; 89:1183–1190.
- Karabulut, keskin I and sagiroglu Y. Relationship between Semen Parameters in Samples Obtained from Sub-fertile Patients Seda. (2017) *Andrology* (Los Angel), an open access journal ISSN: 2167-0250
- Karayiannis D, Kontogianni MD, Mendorou C, Douka L, Mastrominas M, Yiannakouris N. Association between adherence to the Mediterranean diet and semen quality parameters in male partners of couples attempting fertility. *Human Reproduction* 2017; 32:215–22.
- Karma L. Pearce, Amy Hill and Kelton P. Tremellen. Obesity related metabolic endotoxemia is associated with oxidative stress and impaired sperm DNA integrity. Pearce et al. *Basic and Clinical Andrology* (2019) 29:6 <https://doi.org/10.1186/s12610-019-0087-5>
- Karmon AE, Toth TL, Chiu YH, Gaskins AJ, Tanrikut C, Wright DL, et al. Male caffeine and alcohol intake in relation to semen parameters and in vitro fertilization outcomes among fertility patients. *Andrology*. 2017; 5:354–61.
- Ketaki Chandiok, Prakash Ranjan Mondal, Chakraverti Mahajan, and Kallur Nava Saraswathy. Biological and Social Determinants of Fertility Behaviour among the Jat Women of Haryana State, India. *Journal of Anthropology*. Volume 2016, Article ID 5463168, 6 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5463168>

- Khosrowbeygi A and Zarghami N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. *BMC Clinical Pathology* 2007, 7:6 doi: 10.1186/1472-6890-7-6.
- Khosrowbeygi A, Zarghami N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. *BMC Clinical Pathology*. 2007; 7:6.
- Klonoff-Cohen H, Bleha J, Lam-Kruglick P. A prospective study of the effects of female and male caffeine consumption on the reproductive endpoints of IVF and gamete intra-Fallopian transfer. *Human Reproduction*. 2002; 17:1746–54.
- Kobayashi T, Miyazaki T, and Natori M, Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Human Reproduction*. 1991; 6:987–91.
- Kokab A, Akhondi MM, Sadeghi MR, Modarresi MH, Aarabi M, Jennings R, et al. Raised inflammatory markers in semen from men with asymptomatic chlamydial infection. *Journal of Andrology* 2010; 31: 114-20.
- Korasli D, Ziraman F, Ozyurt P, Cehreli SB. Microleakage of selfetch primer/adhesives in endodontically treated teeth. *Journal of the American Dental Association* (1939). 2007; 138(5):634-40.
- Kothari S, Thompson A, and Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2010; 48:425–35.
- Krause W, Bohring C. Inhibin B as a marker of spermatogenesis. *A new dimension in andrology*. *Hautarzt* 2002;53(1):5–10.
- Krausz C, et al. EAA/EMQN best practice guideline or molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology* 2014; 2:5.
- Krausz C, et al. Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction* 2015; 150:R159.
- Kullisaar T, Turk S, Kilk K, Ausmees K, Punab M, Mandar R. Increased levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in male partners of infertile couples. *Andrology*. 2013; 1:850–858
- Kumanov P, Nandipati K, Tomova A and Agarwal A. Inhibin B is a better marker of spermatogenesis than other hormones in the evaluation of male factor infertility. *Fertility and Sterility* .200686332338.(doi:10.1016/j.fertnstert.2006.01.022)

- La Vignera S, Condorelli RA, Balercia G, Vicari E, Calogero AE. Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature. *Asian Journal of Andrology*. 2013; 15:221–5.
- Lamirande E, Gagnon C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 1993; 16:21–5.
- Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Journal of Andrology*. 1992; 13:368–78.
- Lamirande E, Tsai C, Harakata A, Gagnon C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm arcsome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *Journal of Andrology* 1998; 19:585–94.
- Larsen SH, Wagner G, Heitmann BL. Sexual function and obesity. *International Journal of Obesity*. 2007; 31:1189–98.21.
- Latchoumycandane C, Mathur PP. Induction of oxidative stress in the rat testis after short-term exposure to the organochlorine pesticide methoxychlor. *Archives of Toxicology* 2002; 76(12):692-8.
- Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letters* 2008;176(2):149-56.
- Leïla Ammar-Keskes (2013). Atlas de spermologie. Biologie de la reproduction. Faculté de médecine de SFAX.
- Leke R.J.I. et al., (2007) the prevalence of infertility and its preventive measures in sub-Saharan Africa.
- Lettre d'information de l'INVS (Institut de Veille Sanitaire). N°11 du 24 février au 2 mars 2014.
- Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*. 1997; 67:142–7.
- Li Y, Lin H, Li Y, Cao J. Association between socio-psychobehavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertility and Sterility*. 2011; 95:116–23.
- Liu K, Li Y, Zhang G, Liu J, Cao J, Ao L, et al. Association between mobile phone use and semen quality: a systemic review and meta-analysis. *Andrology*. 2014; 2:491–501.

- Lobascio AM, De Felici M, Anibaldi M, Greco P, Minasi MG, and Greco E. Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa. *Andrology* 2015; 3:265–70.
- Lotti F & Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. *Human Reproduction Update*. 2015; 21:56.
- Ludlow H, Muttukrishna S, Hyvönen M, groome, NP. Development of a new antibody to the human inhibin/activin beta B subunit and its application to improvement inhibin B ELISAs. 2008 *Journal of Immunology Methods* 329:102-111.
- Mabeck LM, Jensen MS, Toft G, Thulstrup M, Andersson M, Jensen TK, Giwercman A, Olsen J, Bonde JP. Fecundability according to male serum inhibin B—a prospective study among first pregnancy planners. *Human Reproduction*. 2005; 20:2909–2915.
- Macdonald AA, Stewart AW, Farquhar CM. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones in New Zealand men: a cross-sectional study in fertility clinics. *Human Reproduction*. 2013; 28:3178–87.
- Mahboubi M, Foroughi F, Ghahramani F, Shahandeh H, Moradi S, Shirzadian T. A case-control study of the factors affecting male infertility. *Turkish Journal of Medicine Sciences* (2014) 44: 862-865 © TÜBİTAK doi: 10.3906/sag-1304-35
- Makarim Q A, Rana S A and Muhammad-Baqir F. Relationship between Lipid Peroxidation and Integrity of Sperm Plasma Membrane in a Sample of Iraqi Infertile Men *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* (IOSR-JPBS) e-ISSN: 2278-3008, p-ISSN: 2319-7676. Volume 12, Issue 6 Ver. I (Nov. – Dec. 2017), PP 19-27 www.iosrjournals.org
- Maleki BH, Tartibian B, Vaamonde D. The effects of 16 weeks of intensive cycling training on seminal oxidants and antioxidants in male road cyclists. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 2014; 24:302–7.
- Maleki Hajizadeh B, Tartibian B. Long-term low-to-intensive cycling training: impact on semen parameters and seminal cytokines. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 2015; 25:535–40.
- Manda K, Ueno M, Moritake T, Anzai K. A-lipoic acid attenuates X-irradiation-induced oxidative stress in mice. *Cell Biology and Toxicology*. 2007; 23:129–37.

- Maneesh M, Jayalekshmi H, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. Effect of chronic ethanol administration on testicular antioxidant system and steroidogenic enzyme activity in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2005; 43:445–9.
- Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling1. *Biology of Reproduction*. 2004; 70:910–8.
- Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 47(suppl 3) 469–74.
- Martini AC, Molina RI, Estofan D, Senestrari D, Fiol de Cuneo RD, Ruiz RD. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fertility and Sterility* 2004; 82:374–7.
- Marwan S.M. AL-NIMER, Samir Abdul-Hassan AL-OBAIDI, Khalid S. AL-DULAIMI Serum nitric oxide and peroxynitrite levels in adult sero-positive rheumatoid arthritis treated with disease modifying antirheumatic drugs: a preliminary report. *Turkish Journal of Medicine Sciences* 2010; 40 (2): 191-197
- Marzec-Wróblewska U, Kamiński P, Łakota P (2012). Influence of Chemical Elements on Mammalian Spermatozoa. *Folia Biologica (Praha)* 58:7–15
- Mascarenhas MN, et al. National, regional and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012; 9:1.
- Massin N, et al. Bone mass in young adulthood following gonadotropin-releasing hormone analog treatment and cross-sex hormone treatment in adolescent with gender dysphoria. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2012; 77:593.
- Mathew G, Glenda J, Jack L. Quantitation of nitrite and nitrate in extracellular fluids. *Methods Enzymology*. 1996; 268:237–46.
- Mazzoli S, Cai T, Addonisio P, Bechi A, Mondaini N, Bartoletti R. Chlamydia trachomatis infection is related to poor semen quality in young prostatitis patients. *European Urology* 2010; 57:708-14.
- McPherson NO, Bell VG, Zander-Fox DL, Fullston T, LL W, Robker RL, et al. When two obese parents are worse than one! Impacts on embryo and fetal development. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*. 2015; 309:E568–81.
- Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *European Journal of Endocrinology*. 2001; 145:561–71.

- Meeker JD, Godfrey-Bailey L, and Hauser R. Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. *Journal of andrology*, Vol. 28, No. 3, May/June 2007. American Society of Andrology
- Mehrotra A, Katiyar DK, Agarwal A, Das V, Pant KK. Role of total antioxidant capacity and lipid peroxidation in fertile and infertile men. *Biomedical Research-India*. 2013; 24:347–352.
- Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism*. 2013; 62:457–78
- Misra H, Fridovich I. Estimation of superoxide dismutase. *Journal of Biochemistry*. 1972; 247:3170–8
- Mitchell V, Robin G, Boitrelle F, Massart P, Marchetti C, Marcelli F & Rigot JM. Correlation between testicular sperm extraction outcomes and clinical, endocrine and testicular histology parameters in 120 azoospermic men with normal serum FSH levels. *International Journal of Andrology* 2011 34299–305. (doi:10.1111/j.1365-2605.2010.01094.x)
- Momo Tetsatsi AC, Munyali AD, Bonsou Fozin GR, Ngadjui E, Wankeu-Nya M, Watcho P. Semen quality among men attending urology services in the Dschang Health District, west Cameroon: A retrospective study on 379 cases (2019). *International Journal of Reproductive BioMedicine* Volume 18, Issue no. 2, <https://doi.org/10.18502/ijrm.v18i2.6419> Production and Hosting by Knowledge E.
- Mor A, Driggers PH, Segars JH (2015) Molecular characterization of the human microbiome from a reproductive perspective. *Fertility and Sterility* 104: 1344-1350.
- Moses Olayemi Akiibinu, Adekunle Abiodun Adeshiyan, and Ayodele Olusegun Olalekan: micronutrients and markers of oxidative stress in symptomatic HIV-positive/aids Nigerians: a call for adjuvant micronutrient therapy. *HIOABJ*; Vol. 3; Issue 2; 2012: 7–11
- Mostafa T, Rashed LA, Osman I, Marawan M. Seminal plasma oxytocin and oxidative stress levels in infertile men with varicocele. *Andrologia*. 2015; 47:209–213.
- Murawski M, Saczko J, Marcinkowsha A, et al (2007). Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. *Folia Histochemica Cytobiologica* 45(suppl 1):123–6

- Muthusami KR, Chinnaswamy P. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertility and Sterility* 2005; 84:919–24.
- Myers GM, Lambert-Messerlian GM and Sigman M. Inhibin B reference data for fertile and infertile men in Northeast America. *Fertility and Sterility*. 2009 92:1920–1923. (doi:10.1016/j.fertnstert.2008.09.033)
- Naha N, Chowdhury AR. Inorganic lead exposure in battery and paint factory: effect on human sperm structure and functional activity. *Journal of UOEH* 2006; 28(2):157-71.
- Nahla Al-Bayyari. The effect of cell phone usage on semen quality and fertility among Jordanian males. *Middle East Fertility Society Journal* 22 (2017) 178–182
- Nana P. N., Wandji J. C., Fomulu J. N., Mbu R. E., Leke R. J. I., & Woubinwou M. J (2011). Aspects Psycho-Sociaux chez Patients Infertiles à la Maternité Principale de l'Hôpital Central de Yaoundé, Cameroun. *Clinics in Mother and Child Health*
- Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell Developmental Biology*. 2016; 59:10–26.
- Nguyen Thi Trang, Trieu Tien Sang, Nguyen, Hoang, Nguyen Tan Gia Khanh, Tran Trung Duc. Assessment of the level of seminal zinc and fructose concentration in seminal plasma of Vietnamese infertile men. *MOJ Bioorganic & Organic Chemistry* 2018; 2(4):185–190
- Ni K, Steger K, Yang H, Wang H, Hu K, Zhang T, et al. A comprehensive investigation of sperm DNA damage and oxidative stress injury in infertile patients with subclinical, normozoospermic, and astheno/oligozoospermic clinical varicocele. *Andrology*. 2016; 4:816–24.
- Nicopoulos JD, Almeida PA, Ramsay JW, Gilling-Smith C. The effect of human immunodeficiency virus on sperm parameters and the outcome of intrauterine insemination following sperm washing. *Human Reproduction* 2004; 19:2289-97.
- Nieschlag E, et al. new approaches to the Klinefelter syndrome. *Annales d'Endocrinologie* (Paris) 2014; 75:88.
- Nourhan Mesbah and Hosni Khairy Salem. Genital Tract Infection as a Cause of Male Infertility. Additional information is available at the end of the chapter <http://dx.doi.org/10.5772/62740> Chapter · June 2016 DOI: 10.5772/62740

- O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology Medicine*. 2006; 41:528–40.
- Oates RD. The natural history of endocrine function and spermatogenesis in Klinefelter syndrome: what the data show. *Fertility and Sterility*. 2012; 98:266.
- Ochsendorf FR, Ozdemir K, Rabenau H, Fenner T, Oremek R, Milbradt R, et al. Chlamydia trachomatis and male infertility: chlamydia-IgA antibodies in seminal plasma are C. trachomatis specific and associated with an inflammatory response. *Journal of the European Academy Dermatology Venereology*. 1999; 12:143-52.
- Okafor CD, Meludu SC, Nwaefulu K, Ikechebelu JI, Dioka CE, Obi U. Comparison of serum oxidative stress markers among male partners of fertile and infertile couple at Nnamdi Azikiwe University Teaching Hospital, Nnewi, Anambra State, Nigeria *Journal of Scientific and Innovative Research* 2017; 6(4): 126-128 Available online at: www.jsirjournal.com
- Ola Faris Al-Quzwinia, Hanan A. Al-Tae, Suhaila F. Al-Shaikh. Male fertility and its association with occupational and mobile phone towers hazards: An analytic study. *Middle East Fertility Society Journal* (2016)21, 236–240
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update* 2006; 12:417–35.
- Oliveira PF, Tomas GD, Dias TR, Martins AD, Rato L, Alves MG, et al. White tea consumption restores sperm quality in prediabetic rats preventing testicular oxidative damage. *Reproductive Biomedicine Online* 2015; 31:544–56.
- Ounis L. Les anomalies morphologiques responsables des infertilités masculines dans l'Est Algérien : Aspect épidémiologique et génétique (2015). Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3ème Cycle LMD.
- Öztekin Ü, Caniklioğlu M, Sarı S, et al. (July 10, 2019) Evaluation of Male Infertility Prevalence with Clinical Outcomes in Middle Anatolian Region. *Cureus* 11 (7): e5122. DOI 10.7759/cureus.5122
- Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 2004; 81:802–9.
- Pajarinen J, Karhunen PJ, Savolainen V, Lalu K, Penttilä A, Laippala P. Moderate alcohol consumption and disorders of human spermatogenesis. *Alcohol Clinical and Experimental Research*. 1996; 20:332–7.

- Pajarinen JT, Karhunen PJ. Spermatogenic arrest and 'Sertoli cell-only' syndrome—common alcohol-induced disorders of the human testis. *International Journal of Andrology*. 1994; 17:292–9.
- Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*. 2012; 2:253–63.
- Peakall DB. Phthalate esters: Occurrence and biological effects. *Residue Reviews* 1975; 54:1-41.
- Pierik FH, Burdorf A, de Jong FH & Weber RF. Inhibin B: a novel marker of spermatogenesis. *Annals of Medicine* 2003; 35:12–20. (Doi: 10.1080/07853890310004084)
- Plante M, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertility and Sterility*. 1994; 62:387–93.
- Plotton I, et al. pharmacological management of obesity: an endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015; 100:961.
- Pole A, Dimri M, Dimri G. Oxidative stress, cellular senescence and ageing. *AIMS Molecular Science*. 2016; 3(3):300–324.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertility and Sterility*. 2012 98:294–301. (doi:10.1016/j.fertnstert.2012.05.033)
- Pryor JL, et al. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *New England Journal of Medicine*. 1997; 336:534.
- Queiroz EK, Waissmann W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. *Cad Saude Pu blica* 2006; 22:485–93.
- Raad G, Hazzouri M, Bottini S, Trabucchi M, Azoury J and Grandjean V. Paternal obesity: how bad is it for sperm quality and progeny health? Raad et al. *Basic and Clinical Andrology* (2017) 27:20 DOI 10.1186/s12610-017-0064-9
- Ramasamy R, Chiba K, Butler P, Lamb DJ. Male biological clock: a critical analysis of advanced paternal age. *Fertility and Sterility* 2015; 103:1402–6.
- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Bonde JP, Olsen J, Bech BH. Semen quality according to prenatal coffee and present caffeine exposure: two decades of follow-up of a pregnancy cohort. *Human Reproduction*. 2008; 23:2799–805.

- Rao M, Zhao XL, Yang J, Hu SF, Lei H, Xia W, et al. Effect of transient scrotal hyperthermia on sperm parameters, seminal plasma biochemical markers, and oxidative stress in men. *Asian Journal of Andrology*. 2015; 17:668–75.
- Renaudin H., Bebear C. Evaluation des systèmes Mycoplasma Plus et SIR Mycoplasma pour la détection quantitative et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes génitaux. *Pathologie Biologie*, 1990, 38, n°5, 431-435.
- Ricci E, Al Beitawi S, Cipriani S, Candiani M, Chiaffarino F, Vigano P, et al. Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biomedicine Online* 2017; 34:38–47.
- Ricci E, Vigano P, Cipriani S, Somigliana E, Chiaffarino F, Bulfoni A, et al. Coffee and caffeine intake and male infertility: a systematic review. *Nutrition Journal*. 2017; 16:37. <https://doi.org/10.1186/s12937-017-0257-2>.
- Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AM. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. *Cambridge University Press*; 2000 (91p).
- Rui-Xiang Feng, Jin-Chun Lu, Hong-Ye Zhang, and Nian-Qing Lü. A Pilot Comparative Study of 26 Biochemical Markers in Seminal Plasma and Serum in Infertile Men. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2015, Article ID 805328, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/805328>
- Rutstein SO & Shah IH. DHS Comparative Reports No. 9. Geneva: World Health Organization, 2004.
- Rybar R, Prinosilova P, Kopecka V, Hlavicova J, Veznik Z, Zajicova A, et al. The effect of bacterial contamination of semen on sperm chromatin integrity and standard semen parameters in men from infertile couples. *Andrologia* 2012; 44 Suppl 1:410-8.
- Sadeghi-Nejad H & Oates RD. The Y chromosome and male infertility. *Current Opinion in Urology* 2008; 18:628.
- Salas-Huetos A, Bullo M, Salas-Salvado J. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies. *Human Reproduction Update* 2017; 23:371–89.
- Salas-Huetos A, Bullo M, Salas-Salvado J. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies. *Human Reproduction Update* 2017; 23:371–89.

- Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 2002; 78:1215–24.
- Salenave S, et al. Management of clinically non-functioning pituitary adenoma. *Annales d'Endocrinologie (Paris)* 2012; 73:141.
- Sarfati J, et al. kallmann syndrome with FGFR1 and KAL1 mutations detected during fetal life. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2015; 10:71.
- Sartorius, G. and Nieschlag, E. “Paternal age and reproduction. *Human Reproduction Update*. 2010; 16: 65-79
- Schagdarsurengin U, Western P, Steger K, Meinhardt A (2016) Developmental origins of male subfertility: Role of infection, inflammation and environmental factors. *Seminal Immunopathology* 38: 765-781.
- Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, et al. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Human Reproduction*. 2007; 22:180–7.
- Selmanoglu G, Barlas N, Songur S, Kockaya EA. Carbendaziminduced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats. *Human and experimental Toxicology* 2001; 20(12):625-30.
- Sengupta P, Borges Jr E, Dutta S, Krajewska-Kulak E. Decline in sperm count in European men during the past 50 years. *Human and Experimental Toxicology*. 2017. <https://doi.org/10.1177/0960327117703690>.
- Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Human Reproduction Update* 2013; 19:221–31.
- Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 2013; 19:221–31.
- Shamsi MB, Kumar R, Malhotra N, Singh N, Mittal S, Upadhyay AD, Dada R. Chromosomal aberrations, Yq microdeletion, and sperm DNA fragmentation in infertile men opting for assisted reproduction. *Molecular reproduction and development*. 2012; 79:637–650.

- Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2013;11:66.<https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-66>.
- Sharma R, Harlev A, Agarwal A, Esteves SC. Cigarette smoking and semen quality: a new meta-analysis examining the effect of the 2010 world health organization laboratory methods for the examination of human semen. *European Urology* 2016; 70:635–45.
- Sharma R, Harlev A, Agarwal A, Esteves SC. Cigarette smoking and semen quality: a new meta-analysis examining the effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *European Urology*. 2016; 70:635–45.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *FEBS Journal* 1993; 215:213–9.
- Sikaris K, McLachlan RI, Kazlauskas R, de Kretser D, Holden CA and Handelsman DJ. Reproductive hormone reference intervals for healthy fertile young men: evaluation of automated platform assays. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005;90:5928–5936. (doi:10.1210/jc.2005-0962)
- Sina D, Schuhmann R, Abraham R, Taubert HD, Dericks-Tan JS. Increased serum FSH levels correlated with low and high sperm counts in male infertile patients. *Andrologia*. 1975; 7:31–37.
- Sinha A. Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*. 1972; 47:389–94.
- Sobreiro BP, Lucon AM, Pasqualotto FF, Hallak J, Athayde S, Arap S. Semen analysis in fertile patients undergoing vasectomy: reference values and variations according to age, length of sexual abstinence, seasonality, smoking habits and caffeine intake. *Sao Paulo Medicine Journal*. 2005; 123:161–6.
- Speroff L, Fritz MA. "Female infertility, Chapter 27", *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Eighth Edition Lippincott Williams & Wilkins, 2010, syf: 1157.
- Spira A. Epidemiology of human reproduction. *Human Reproduction* 1986; 1:111–5.
- Stefan Stephanus du Plessis, Sheila Gokul, Ashok Agarwal. Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures. *Frontiers in Bioscience, Elite*, 5, 224-231, January 1, 2013.
- Stone BA, Alex A, Werlin LB, Marrs RP. Age thresholds for changes in semen parameters in men. *Fertility and Sterility* 2013; 100:952–8.

- Subhan F, Tahir F, Ahmad R, Khan ZD. Oligospermia and its relation with hormonal profile. *Journal of Pakistan Medical Association*. 1995; 45:246–247.
- Subramanian V, Ravichandran A, Thiagarajan N, Govindarajan M, Dhandayuthapani S, Suresh S. Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility. <https://doi.org/10.5653/cerm.2018.45.2.88> pISSN 2233-8233 ·eISSN 2233-8241 *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 2018; 45(2):88-93
- Sunny O. Abarikwu. Causes and Risk Factors for Male-Factor Infertility in Nigeria: A Review. *African Journal of Reproductive Health* 2013; 17[4]: 150-166
- Sutton M, Sternberg M, Koumans EH, McQuillan G, Berman S, Markowitz L. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001-2004. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 45:1319-26.
- Syed Mohsin Manzoor, Abdus Sattar, Rizwan Hashim, Farooq Ahmad Khan, Muhammad Younas, Asif Ali, Muhammad Dilawar, Amir Ijaz. Serum inhibin b as a diagnostic marker of male infertility. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad* 2012; 24(3-4)
- Tang K, Xue W, Xing Y, Xu S, Wu Q, Liu R, Wang X, Xing J. Genetic Polymorphisms of Glutathione S-Transferase M1, T1, and P1, and the Assessment of Oxidative Damage in Infertile Men With Varicoceles From Northwestern China. *Journal of andrology*. 2012; 33:257–263
- Tapanainen JS, et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nature Genetics* 1997; 15:205.
- Tavilani H, Goodarzi MT, Doosti M, Vaisi-Raygani A, Hassanzadeh T, Salimi S, et al. Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online* 2008; 16:649–56.
- Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang AM, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*. 2009; 24:2061–70.
- Tiligada E. Chemotherapy: induction of stress responses. *Endocrine-Related Cancer*. 2006; 13(Suppl. 1):S115–24.

- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA before and after density gradient centrifugation: implication for assisted conception. *European Society of Human Reproduction and Embryology. Human Reproduction* 2001 Vol. 16, No. 10, pp 2160-2165.
- Toshinobu Miyamoto, Akira Tsujimura, Yasushi Miyagawa, Eitetsu Koh, Mikio Namiki, and Kazuo Sengoku. Male Infertility and Its Causes in Human. *Advances in Urology. Volume 2012, Article ID 384520, 7pages doi:10.1155/2012/384520.*
- Townsend CL, Cortina-Borja M, Peckham CS, de Ruiter A, Lyall H, Tookey PA. Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000-2006. *AIDS* 2008; 22:973-81.
- Trabado S, et al. Congenital hypogonadotropic hypogonadism and kallmann syndrome as models for studying hormonal regulation of human testicular endocrine functions. *Annales d'Endocrinologie (Paris)* 2014; 75:79.
- Traish AM, Feeley RJ, Guay A. Mechanisms of obesity and related pathologies: androgen deficiency and endothelial dysfunction may be the link between obesity and erectile dysfunction. *FEBS*. 2009; 276:5755–67.
- Tremellen K. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Human Reproduction Update* 2008; 14:243–58.
- Trimoulet P. Diagnostic des Hépatites virales B et C. Laboratoire de Virologie, CHU de Bordeaux 2015.
- Trum JW, Mol BW, Pannekoek Y, Spanjaard L, Wertheim P, Bleker OP, et al. Value of detecting leukocytospermia in the diagnosis of genital tract infection in subfertile men. *Fertility and Sterility* 1998; 70:315–9.
- Tyrrell JB, Findling JW, Aron DC. Hypothalamus and pituitary. In: Greenspan FS, Baxter JD, (Eds). *Basic and clinical endocrinology*. 4th ed. New York: Appleton and Lange; 1994.p. 64–127.
- Uhler ML, Zinaman MJ, Brown CC & Clegg ED. Relationship between sperm characteristics and hormonal parameters in normal couples. *Fertility and Sterility* 2003 79:1535–1542. (Doi: 10.1016/S0015-0282(03)00336-4)
- UNAIDS. UNAIDS world AIDS day report 2011 [Internet]. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS); [cited 2013 Jan 30]. Available from:

http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2011/JC2216_WorldAIDSday_report_2011_en.pdf.

- VanUffelen BE, Van der Zee J, deKoster BM, VanStereninck J, Elferink JG. Intracellular but not extracellular conversion of nitroxyl anion into nitric oxid leads to stimulation of human neutrophil migration. *Biochemistry Journal*. 1998; 330(pt2):719-722.
- Velho ALC, Menezes E, Dinh T, Kaya A, Topper E, Moura AA, et al. (2018). Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. *PLoS ONE* 13(4): e 0195279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195279>
- Venkatesh S, Shamsi MB, Deka D, Saxena V, Kumar R, Dada R. Clinical implications of oxidative stress & sperm DNA damage in normozoospermic infertile men. *Indian Journal of Medicine Research*. 2011; 134:396–398.
- Vigano P, Chiaffarino F, Bonzi V, Salonia A, Ricci E, Papaleo E, et al. Sleep disturbances and semen quality in an Italian cross sectional study. *Basic Clinical Andrology* 2017; 27:16. <https://doi.org/10.1186/s12610-017-0060-0>.
- Vigil P, Morales P, Tapia A, Riquelme R, Salgado AM. Chlamydia trachomatis infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. *Andrologia* 2002; 34:155-61.
- Vine MF, Margolin BH, Morrison HI, Hulka BS. Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis. *Fertility and Sterility* 1994; 61:35–43.
- Virtanen HE & Toppari J. Cryptorchidism and Fertility. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*. 2015; 44:751.
- Von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG & Nieschlag E. Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84:2496–2501. (doi:10.1210/jcem.81.4.8636341)
- Wagner L. Androgènes et système reproducteur masculin - Androgènes, vieillissement masculin et fertilité. *Progrès en Urologie*, 2004, 14, 769-776
- WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, Fourth Edition, Cambridge University Press, 1999.
- Wong T, Singh A, Mann J, Hansen L, McMahon S. Gender differences in bacterial STIs in Canada. *BMC Womens Health* 2004; 4:S26.

- World Health Organization (WHO). Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, Fourth Edition, Cambridge University Press, 1999.
- World Health Organization (WHO). WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010.
- World Health Organisation (WHO). Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections overview and estimates [Internet]. Geneva: WHO; c2013 [cited 2012 Jul 24]. Available from: http://www.who.int/hiv/pub/sti/who_hiv_aids_2001.02.pdf.
- World Health Organisation (WHO). Standards for maternal and neonatal care. Prevention of mother-to-child transmission of syphilis. Integrated management of pregnancy and childbirth (IMPAC) [Internet]. Geneva: WHO; c2013 [cited Jan 30]. Available from http://www.who.int/reproductivehealth/publications/maternal_perinatal_health/prevention_mtct_syphilis.pdf.
- World Health Organization (WHO). Initiative for vaccine research (IVR): sexually transmitted diseases [Internet]. Geneva: WHO; c2013 [cited 2013 Jan 30]. Available from http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_std/en/index2.html.
- World Health Organization (WHO). WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. 2000, Cambridge University Press: Cambridge.
- Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive Biomedicine Online* 2014; 28:684–703.
- Wu C, Lipshultz LI, Kovac JR. The role of advanced paternal age in modern reproductive medicine. *Asian Journal of Andrology* 2016; 18:425. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.179251>.
- Wu TP, Huang BM, Tsai HC, Lui MC, Liu MY. Effects of nitric oxide on human spermatozoa activity, fertilization and mouse embryonic development. *Archives of Andrology* 2004; 50(3):173-9.
- Xu DX, Shen HM, Zhu QX, Chua L, Wang QN, Chia SE, et al. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutation Research* 2003; 534(1-2):155-63.

- Yao-Yuan Hsieh, Yu-Ling Sun, Chi-Chen Chang, Yi-San Lee, Horng-Der Tsai, and Chich-Sheng Lin. Superoxide Dismutase Activities of Spermatozoa and Seminal Plasma Are Not Correlated With Male Infertility. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16:127–131 (2002).
- Yatsenko AN, et al. X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *The New England Journal of Medicine*. 2015; 372:2097.
- Young J. Approach to the male patient with congenital hypogonotropic hypogonadism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2012; 97:707.
- Yu J, et al. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systematic review and a meta-analysis. *Human Reproduction* 2012; 27:25.
- Zago MP, Oteiza PI. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001; 31:266–74.
- Zahoor Ahmed, Muhammad Shoaib Khan, Mudassir Ahmad Khan, Amin ul Haq, Jamil ur Rahman. Seminal fructose in various classes of infertile Patients. *Pak J Physiol* 2010;6(1) <http://www.pps.org.pk/PJP/6-1/Zahoor.pdf>
- Zeba-Un-Naher, M Ali, SK Biswas, N Kamrun, Bashar T, MI Arslan (2011). Study of seminal mda level as an oxidative stress marker in Infertile male. *Journal of Science Foundation*, 9(1&2): 85-93, ISSN 1728-7855
- Zhang ZB, Jiang YT, Yun X, Yang X, Wang RX, Dai RL, et al. Male infertility in Northeast China: a cytogenetic study of 135 patients with non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* .2012; 29:83–7.
- Zhao J, Leung JY, Lin SL, and Schooling CM. Cigarette smoking and testosterone in men and women: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Preventive Medicine*. 2016; 85:1–10.
- Zunjarrao G. Badade, Kavita M. More, Jayshree G. Narshetty, Vandana. Z. Badade, BirendraKumar Yadav. Human Seminal oxidative stress: correlation with antioxidants and sperm quality parameters. *Scholars Research Library Annals of Biological Research*, 2011, 2 (5):351-359 (<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)

ANNEXES

ANNEXES 1 :
AUTORISATIONS ADMINISTRATIVES

COMITE NATIONAL D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE POUR LA SANTE HUMAINE

Arrêté N° 0977/A/MINSANTE/SESP/SG/DROS/ du 18 avril 2012 portant création, organisation et fonctionnement des comités d'éthique de la recherche pour la santé humaine au sein des structures relevant du Ministère en charge de la santé publique

N° 2015/04/572/CE/CNERSH/SP

Yaoundé, le 08 avril 2015

Cnethique_minsante@yahoo.fr

CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d'Éthique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH), en sa session ordinaire du 15 janvier 2015, a examiné le projet de recherche intitulé : «**Évaluation de la qualité de l'ADN des spermatozoïdes d'un groupe de patients camerounais : implication du stress oxydatif et des séquelles infectieuses**», soumis par Mme TCHOULA MAMIAFO Corinne, Investigateur Principal, étudiante à la Faculté des Sciences, Université de Yaoundé 1.

Le projet est d'un grand intérêt scientifique et social. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact du stress oxydatif et des séquelles infectieuses sur la qualité de l'ADN des spermatozoïdes d'un groupe d'hommes de la population camerounaise. La procédure de l'étude est bien documentée et claire. La notice d'information et les fiches de consentement éclairé, en français et en anglais, sont bien élaborés et simples à comprendre. Les mesures prises pour garantir la confidentialité des données collectées sont précisées dans le document. Le CV de l'Investigateur Principal le décrit comme une personne compétente, capable de mener à bien cette étude. Pour toutes ces raisons, le Comité National d'Éthique approuve pour une durée d'un an, la mise en œuvre de la présente version du protocole.

L'étudiante TCHOULA MAMIAFO Corinne est responsable du respect scrupuleux du protocole approuvé et ne devrait y apporter aucun amendement aussi mineur soit-il, sans avis favorable du CNERSH. Les investigateurs sont appelés à collaborer pour toute descente du CNERSH pour le suivi de la mise en œuvre du protocole approuvé. Le rapport final du projet devra être soumis au CNERSH et aux autorités sanitaires du Cameroun.

La présente clairance peut être retirée en cas de non respect de la réglementation en vigueur et des recommandations susmentionnées.

En foi de quoi, la présente clairance éthique est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Ampliations

- MINSANTE



N.B : cette clairance éthique ne vous dispense pas de l'autorisation administrative de recherche (AAR), exigée pour mener cette étude sur le territoire camerounais. Cette dernière vous sera délivrée par le Ministère de la Santé Publique.



GTAB LABO



LABORATOIRE D'ANALYSES MEDICALES

Arrêté N° 582 CAB/PR du 29 Août 1985

B.P. 3105 Yaoundé Messa

Tél. : 99 80 81 85 / 33 17 32 73

A côté de la Pharmacie KETCHI (Centre d'Imagerie Médicale) MADAGASCAR

Yaoundé, le 14 octobre 2015

Le Directeur

A

Madame TCHOULA MAMIAFO Corinne

Objet : Demande d'autorisation de recherche

Madame,

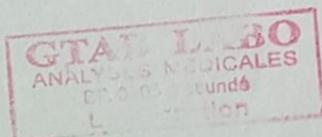
Faisant suite votre demande d'autorisation de recherche du 06 octobre 2015 dont le sujet est intitulé « Evaluation de la qualité de l'ADN des spermatozoïdes d'un groupe de patients camerounais : implication du stress oxydatif et des séquelles infectieuses ».

Nous avons l'honneur de marquer notre accord pour l'utilisation de notre laboratoire pour la réalisation de ces travaux de recherche. En effet, le sujet est d'actualité et sa pertinence n'est plus à démontrer. Nous estimons que les résultats seront salutaires pour le monde scientifique et pour la santé publique.

Nous vous souhaitons bon courage et beaucoup de sérénité.

Espérant avoir répondu favorablement à votre demande d'autorisation de recherche, veuillez agréer Madame, l'expression de notre sincère collaboration.

Le Directeur



Augustin Mpoame
Microbiologiste
Diplômé de l'Université P et M. Curie
Faculté de Médecine la Pitié Salpêtrière
Paris VIe

GTAB LABO : Laboratoire des techniques du biomédical – Diagnostic des IST/SIDA -Suivie biologique des travailleurs
- Bilans de santé -bilans prénuptiaux et prénatales -Couverture biologique des manifestations.
Registre de commerce N°2003A0297/Registre chronologique N°0308/ Contribuable N°p117200263436E
Nous ouvrons désormais nos portes 24h/24 et 7j/7 ; Urgences assurées IN° CNPS 321-0102914-N
GTAB Laboratoire et tout son personnel sont heureux de vous souhaiter bonne guérison!



SARLU
LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES
- DU CENTRE -
OLEZOA, FACE M.D.O. ENTRE L'HOTEL PRESTIGE ET LA PHARMACIE XAVYO
Enr. N° 014/MSP***Tél : (237) 22 23 04 74 Fax : (237) 22 23 90 19**** BP 14.754 Yaoundé
Email : laboratoirecentre@yahoo.fr



Yaoundé, le 14 octobre 2015

A

Madame TCHOULA MAMIAFO Corinne
Doctorante université de Yaoundé I

Objet : réponse à votre demande d'autorisation de recherche

Madame,

Je vous informe par la présente que je vous accorde l'autorisation de recherche dans mon établissement conformément à votre demande.

Vous pourrez y séjourner pendant au moins trois (03) mois minimum.

Dès que vous serez en mesure de commencer, je vous transmettrai les conditions de travail à respecter pendant votre séjour au laboratoire.

Veillez faire part de notre acceptation au Pr NGOGANG Jeanne Yonkeu
et au Pr PJEME Constant Anatole.

Recevez madame mes salutations distinguées.

Dr MVONDO OTTOU ANANIE

Directeur General Fondateur LAMC

Pharmacien Biologiste

LABORATOIRE DU CENTRE ET DE BASTOS
ANALYSES MEDICALES
Directeur Général et Fondateur
A. MVONDO OTTOU ANANIE
Pharmacien Biologiste
Tel. 99 91 76

REPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix - Travail - Patrie

MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE

HOPITAL GENERAL DE YAOUNDE

DIVISION MEDICALE ET TECHNIQUE

BP 5408 YAOUNDÉ - CAMEROUN
TEL : (237) 22 21 31 81 - FAX : (237) 22 21 20 15.



REPUBLIC OF CAMEROON
Peace - Work - Fatherland

MINISTRY OF PUBLIC HEALTH

YAOUNDE GENERAL HOSPITAL

TECHNICAL AND MEDICAL DIVISION

Yaoundé, le 07 JUN 2015

Le Directeur Médical et Technique
Technical and Medical Division

A : Mlle TCHOULA MAMIAFO Corinne
Etudiante à la Faculté de Sciences
FMSB - Université Yaoundé I
Email : tchoulacorinne@yahoo.fr
Tél : 696 02 17 00

Objet :
*V/Demande d'autorisation
de recherches.*

Mademoiselle,

Faisant suite à votre correspondance du 25 mai 2015 se rapportant à l'objet repris en marge,

Nous marquons notre accord pour que vous effectuez vos travaux de recherche à l'Hôpital Général de Yaoundé afin d'y obtenir les données probantes pour votre sujet d'études portant sur : « **EVALUATION DE LA QUALITE DE L'ADN DES SPERMATOZOIDES D'UN GROUPE DE PATIENTS CAMEROUNAIS : IMPLICATION DU STRESS OXYDATIF ET DES SEQUELLES INFECTIEUSES** ».

Pendant la durée de vos recherches, vous devez vous conformer au règlement intérieur de l'établissement. Toutefois, les publications se rapportant à ce travail devraient inclure les médecins de l'Hôpital Général de Yaoundé.

Recevez, Mademoiselle, nos salutations distinguées./-

Ampliations :

- DMT
- Chef service Consultations Externes
- Chef unité des Archives Médicales
- Chrono/archives.

07 JUN 2015

Le Directeur Médical et Technique,

Professeur NOUEDOU Christophe
Agrégé Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Diplômé de Cardiologie
HÔPITAL GENERAL YAOUNDE

REPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix - Travail - Patrie

MINISTRE DE LA SANTE PUBLIQUE

SECRETARIAT GENERAL

DIRECTION DE L'HOPITAL CENTRAL DE YAOUNDE.

N° 726 L/MINSANTE/SG/DHCY/ CM



REPUBLIC OF CAMEROUN
Peace - Work - Fatherland

MINISTRY OF PUBLIC HEALTH

SECRETARIAT GENERAL

DIRECTORATE OF THE YAOUNDE CENTRAL HOSPITAL

Yaoundé, le 13 JAN. 2015

Le Directeur de l'Hôpital Central de Yaoundé

A

Mme TCHOULA MAMIAFO

Objet : votre autorisation pour le recrutement des patients

Madame,

Je viens par la présente lettre marquer mon accord pour le recrutement des patients dans le cadre de votre projet : « **évaluation de la qualité de l'ADN des spermatozoïdes d'un groupe des patients Camerounais : implication du stress oxydatif et des séquelles infectieuses** » dans les services de : Gynécologie-obstétrique et Urologie de l'Hôpital Central de Yaoundé. A cet effet, veuillez prendre attache avec les chefs des services sollicités.

Un exemplaire de votre travail doit être déposé à la bibliothèque de l'Hôpital Central de Yaoundé

Vous êtes tenu au strict respect du règlement intérieur de l'Hôpital Central de Yaoundé pendant vos recherches.

Veuillez agréer Madame, l'expression de ma parfaite considération. /.

Pour le Directeur et par ordre



Le Conseiller Médical

Pr. Djentcheu Vincent

www.hopitalcentral.org

BP : 87 Yaoundé. Tél/Fax (237) 22 23 20 89 E-mail : Hopitalcentral@Yahoo.Fr "Point focal responsable des stages"

QUESTIONNAIRE

Noms et Prénoms :.....
Age :.....
Profession :.....
Région d'origine :.....
Région de résidence :.....
Situation matrimoniale :.....
Poids :.....
Taille :.....
IMC :.....
Numéros de téléphone :.....
Autre Numéro (femme/parents/amis) :.....
Email :.....

Fertilité personnelle et familiale	
<p>➤ Histoire du désir de grossesse</p> <p>Avez-vous des enfants ? si oui combien ?</p> <p>Depuis combien de temps n'arrivez-vous plus en avoir d'autre ?</p> <p>Sinon Depuis combien de temps désirez-vous un enfant ?</p>	
<p>➤ Analyses sperme antérieures</p> <p>Avez-vous déjà fait un spermogramme ? Si oui quel était les conclusions?</p> <p>Avez-vous déjà fait une spermoculture ? Si oui quel en était le ou les résultat(s) ?</p>	
<p>➤ Unions antérieures</p> <p>Combien de relations sérieuses avez-vous eu auparavant ?</p>	
<p>➤ ATCD Procréation Médicalement Assistée</p> <p>Avez-vous déjà eu recours à la PMA ?</p> <p>Si oui quand ? Que s'est-il passé ?</p>	

<p>➤ Consanguinité parentale</p> <p>Avez-vous des liens de parenté avec votre conjointe ?</p> <p>Vos parents ont-ils des liens de parenté ?</p>	
<p>➤ Délais à concevoir des parents</p> <p>En moyenne quelle est la différence d'âge entre vos frères ?</p> <p>Étais-ce voulu par vos parents ?</p>	
ATCD médicaux	
<p>Avez-vous déjà souffert :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ de Cryptorchidie (absence de testicule dans les bourses)? ▪ d'une MST ? ▪ d'une Infection génito-urinaire (Préciser)? ▪ maladie génétique ? ▪ oreillons ? ▪ Varicelle ? ▪ Hypertension Artérielle ? ▪ Diabète ? ▪ Fièvre récente ? ▪ Paludisme récent ? (précisez date) 	
<p>Avez-vous déjà subi une radio-chimiothérapie (Préciser années)?</p>	
ATCD chirurgicaux	
<p>Avez-vous déjà subi une :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Chirurgie abdominale et pelvienne (lésion sympathique) ? ▪ Opérations sur les testicules (âge de la descente chirurgicale) ? ▪ Cure de hernie (3-17% lésion) ? ▪ Orchidectomie (Ablation des testicules)? 	
Sexualité	

Quelle est la Fréquence des rapports non protégés avec votre conjointe?	
Avez-vous des érections ?	
Sur une échelle de 1 à 10 comment évaluez-vous votre libido (désir sexuel)?	
Avez-vous des Ejaculation ante-portas (avant la pénétration) ?	
Utilisez-vous des Lubrifiants et/ou spermicides lors de vos rapports ?	
Divers	
Etes-vous exposés à des Toxiques ?	
Prenez-vous des Médicaments (HTA, diabète, hyperlipidémie...) ?	
Autres ?	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fumez-vous de la cigarette ? (Fréquence et/ou quantité) ➤ Buvez-vous de l'alcool ? (Fréquence et/ou quantité) ➤ Quelle est en moyenne le temps qui s'écoule entre votre dernier repas et votre coucher ? ➤ Gardez-vous souvent votre téléphone dans la poche ? (Toujours....souvent....jamais....) ➤ Posez-vous souvent votre ordinateur sur les genoux ? (Toujours....souvent....jamais....) ➤ Mangez-vous souvent des Fast-food ? (Toujours....souvent....jamais....) ➤ Portez-vous des vêtements serrés ? (Toujours....souvent....jamais....) ➤ Consommez-vous des aliments très gras ? (jamais.....souvent.....enormément.....) ➤ Consommez-vous de la viande rouge ? (jamais.....souvent.....enormément.....) ➤ Consommez-vous des produits laitiers ? (jamais.....souvent.....enormément.....) ➤ Consommez-vous du café ? (jamais.....souvent.....enormément.....) ➤ Consommez-vous du sucre ? (jamais.....souvent.....enormément.....) ➤ Faites-vous du sport ? (jamais.....souvent.....enormément.....) ➤ En moyenne quelle quantité d'eau buvez-vous par jour ? 	

Bilans complémentaires:	
Imagerie (Echographie ? conclusion.....	
Radiographie ?	
Chlamydiae ?..... Mycoplasme ?..... Syphilis ?..... Sérologie HIV ?.....HBV ?.....HCV ?.....	

FICHE D'INFORMATION

Vous êtes invité à participer à une étude destinée à déterminer l'implication du stress oxydatif et des séquelles infectieuses dans l'infertilité. La durée de l'investigation est de 06 mois, ainsi nous conserverons les échantillons pendant au moins 2 ans pour des analyses futures. A cet effet vous serez soumis à un questionnaire et de quelques analyses biologiques d'échantillons. Vous devriez nous fournir des échantillons de sang (collecté par le personnel du laboratoire) et de sperme (collecté vous-même ou avec l'aide de votre épouse **uniquement par masturbation** au sein du laboratoire).

Cette étude s'intitule : « **Evaluation de la qualité de l'ADN des spermatozoïdes d'un groupe de patients camerounais : implication du stress oxydatif et des séquelles infectieuses** ».

Investigateur principal :

- **TCHOULA MAMIAFO Corinne**, étudiante en 2^{ième} année (PhD) en Biochimie à l'université Yaoundé I. 696 021 700/ 679 745 694

Directeurs :

- **Pr. NGOGANG Jeanne YONKEU**, Professeur agrégé de Biochimie, Chef du service de biochimie au CHUY. jngogang@yahoo.fr
- **Dr. Constant PIEME Anatole**, Docteur en Biochimie et Chargé de cours à la FMSBY. apieme@yahoo.fr
- **Comité National d'Éthique de la recherche pour la santé humaine**, 22 23 49 34/ 22 76 21 14, cnethique_minsante@yahoo.fr

Confidentialité : Je m'engage à respecter strictement votre anonymat tout au long de l'étude. Notre questionnaire portera un code qui ne permettra pas de vous identifier.

Droit de refus : Votre participation à cette étude est entièrement **volontaire**. Vous êtes entièrement libre d'accepter ou de refuser d'y participer ou même d'interrompre votre participation à n'importe quel moment, sans que cela ne pose de préjudice quelconque.

Risques: Les participants ne courent aucun risque de voir leurs résultats divulgués. Leur seul bénéfice en participant à cette étude est :

Avantage:

- De les restituer leurs résultats

Motivation: Votre seul bénéfice en participant à cette étude est :

- ❖ Vous restituer les résultats

Valeurs sociales : amélioration de la prise en charge des patients souffrant d'infertilité.

Limite: inconnue.

Fait à Yaoundé, le.... /...../2014

Signature de l'investigateur

Signature du chef du laboratoire

CONSENTEMENT ECLAIRE

J'ai lu et compris les termes de l'étude, ainsi que les avantages et les risques potentiels liés à ma participation. J'ai eu la possibilité de poser des questions et J'ai reçu **oralement et par écrit** toutes les informations nécessaires pour comprendre l'intérêt et le déroulement de l'étude, les bénéfices attendus, les contraintes et les risques prévisibles.

Je comprends qu'en signant le présent formulaire, j'autorise l'équipe responsables de l'étude à accéder à mes données personnelles et à me prélever.

Je comprends que **je suis libre d'accepter ou de refuser ce geste**, sans avoir à motiver mon choix. J'ai eu un temps de réflexion suffisant pour prendre ma décision.

J'ai disposé d'un délai de réflexion suffisant entre les informations reçues et ce consentement avant de prendre ma décision.

Par la présente, je donne mon consentement éclairé pour participer à cette étude et que mes échantillons puissent être utilisés dans des études ultérieures. J'ai reçu un exemplaire du formulaire d'information au patient.

Je soussigné code du patient.....

CNI n°..... Délivré le/...../..... à Tél.....

Déclare avoir été invité(e) à participer à l'étude intitulée « **Evaluation de la qualité de l'ADN des spermatozoïdes d'un groupe de patients camerounais : implication du stress oxydatif et des séquelles infectieuses** » et avoir pris connaissance des informations qui y sont relatives.

Yaoundé, le...../...../2013

Signature de l'investigateur

Signature du Chef du laboratoire

ANNEXES 2 :
KITS POUR DOSAGES



Monobind Inc.
Lake Forest, CA 92630, USA

AccuBind
ELISA Microwells

**Follicle Stimulating Hormone (FSH)
Test System**
Product Code: 425-300

Intended Use: The Quantitative Determination of Follicle Stimulating Hormone Concentration in Human Serum by a Microplate Immunoenzymometric Assay (EMELISA)

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Follicle Stimulating hormone (FSH) is a glycoprotein consisting of two subunits with an approximate molecular mass of 35,000 daltons. The α -subunit is similar to other pituitary hormones (Luteinizing stimulating hormone (LH), thyroid stimulating hormone (TSH) and chorionic gonadotropin (CG)) while the β -subunit is unique. The β -subunit confers the biological activity to the molecule. Stimulation by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) causes release of FSH, as well as LH, from the pituitary and is transported by the blood to their sites of action, the testes in males.

In men, FSH acts on the Sertoli cells of the testis, stimulating the synthesis of inhibin, which appears to specifically inhibit further FSH secretion, and androgen-binding protein. Thus, it indirectly supports spermatogenesis.

In women, FSH acts on the granulosa cells of the ovary, stimulating steroidogenesis. All ovulatory menstrual cycles have a characteristic pattern of FSH, as well as LH, secretion. The menstrual cycle is divided into a follicular phase and a luteal phase by the midcycle surge of the gonadotropins (LH and FSH). As the follicular phase progresses, FSH concentration decreases. Near the time ovulation occurs, about midcycle, FSH peaks decrease in magnitude than LH to its highest level.

The clinical usefulness of the measurement of Follicle Stimulating hormone (FSH) in ascertaining the homeostasis of fertility regulation via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis has been well established (1,2).

In this method, FSH calibrator, patient specimen or control is first added to a streptavidin coated well. Biotinylated monoclonal and enzyme labeled antibodies (directed against distinct and different epitopes of FSH) are added and the reactions mixed. Reaction between the various FSH antibodies and native FSH forms a sandwich complex that binds with the streptavidin coated to the well.

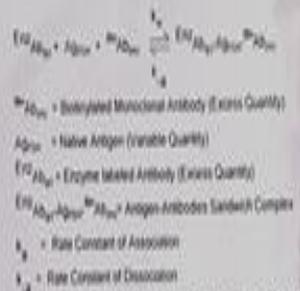
After the completion of the required incubation period, the enzyme-Follicle Stimulating Hormone antibody bound conjugate is separated from the unbound enzyme-labeled stimulating hormone complex by separation or decantation. The activity of the enzyme present on the surface of the well is quantitated by reaction with a suitable substrate to produce color.

The employment of several serum references of known Follicle Stimulating Hormone levels permits construction of a dose response curve of activity and concentration. From comparison to the dose response curve, an unknown specimen's activity can be correlated with Follicle Stimulating Hormone concentration.

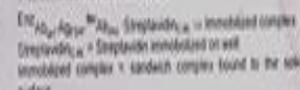
PRINCIPLE

Immunoenzymometric assay (TYPE 2)

The essential reagents required for an immunoenzymometric assay include high affinity and specificity antibodies enzyme and immobilized, with different and distinct epitope recognition, in excess, and native antigen. In this procedure, the immobilization takes place during the assay at the surface of a microplate well through the interaction of streptavidin coated on the well and exogenously added biotinylated monoclonal anti-FSH antibody. Upon mixing monoclonal biotinylated antibody, the enzyme-labeled antibody and a serum containing the native antigen, reaction results between the native antigen and the antibodies without competition or steric hindrance to form a soluble sandwich complex. The interaction is illustrated by the following equation:



Simultaneously, the complex is deposited in the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody. The interaction is illustrated below:



After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by decantation or aspiration. The enzyme activity of the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. By using several different serum references of known antigen values, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

REAGENTS

Materials Provided:

- A. FSH Calibrators - 1 vial - lots A-F**
Six (6) vials of references for FSH Antigen at levels of (500, 500, 1000, 2500, 5000 and 10000) mIU/ml. Store at 2-8°C. A preservative has been added.
Note: The calibrators, human serum based, were calibrated using a reference preparation which was assigned against the WHO 2nd IRP (78/54).
- B. FSH Enzyme Reagent - 13 vial - lots 1-13**
One (1) vial containing enzyme labeled antibody, biotinylated monoclonal mouse IgG in buffer, dye, and preservative. Store at 2-8°C.
- C. Streptavidin Coated Plate - 96 wells - lots 1-4**
One 96-well microplate coated with streptavidin and packaged in an aluminum bag with a drying agent. Store at 2-8°C.
- D. Wash Solution Concentrate - 20 ml - lots 1-4**
One (1) vial containing a surfactant is buffered saline. A preservative has been added. Store at 2-30°C.
- E. Substrate A - 7 vial - lots 5-7**
One (1) vial containing tetraethylbenzidine (TEB) in buffer. Store at 2-8°C.
- F. Substrate B - 7 vial - lots 8-10**
One (1) vial containing hydrogen peroxide (H₂O₂) in buffer. Store at 2-8°C.

G. Stop Solution - 6 vial - lots 11-16
One (1) vial containing a strong acid (1N HCl). Store at 2-30°C.

H. Product Instructions:
Note 1: Do not use reagents beyond the kit expiration date.
Note 2: Opened reagents are stable for only (30) days when stored at 2-8°C.
Note 3: Above reagents are for a single 96-well microplate.

- Required But Not Provided:**
- 1. Pipette capable of delivering 50µl volumes with a precision of better than 1.5%.
 - 2. Dispensers for repetitive deliveries of 0.100ml and 0.330ml volumes with a precision of better than 1.5%.
 - 3. Microplate washers or a squeeze bottle (optional).
 - 4. Microplate Reader with 400nm and 620nm wavelength absorbance capability.
 - 5. Absorbent Paper for blotting the microplate wells.
 - 6. Plastic wrap or microplate cover for incubation steps.
 - 7. Vacuum aspirator (optional) for wash steps.
 - 8. Timer.
 - 9. Quality control materials.

PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic Use
Not for Internal or External Use in Humans or Animals
All products that contain human serum have been found to be nonreactive for hepatitis B Surface Antigen, HIV 1&2 and HCV Antibodies by FDA licensed reagents. Since no known test can offer complete assurance that infectious agents are absent, all human serum products should be handled as potentially hazardous and capable of transmitting disease. Good laboratory procedures for handling blood products can be found in the Center for Disease Control / National Institute of Health, "Guidelines for Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1985, HHS Publication No. (CDC) 88-2035.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The specimens shall be blood, serum in type and the usual procedures in the collection of quantitative samples should be observed. For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained. The blood should be collected in a plain red-top vacuum tube without additives or anti-coagulants. Allow the blood to clot. Centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Serum may be refrigerated at 2-8°C for a maximum period of five (5) days. If the specimen cannot be assayed within this time, the samples may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing. When assayed in duplicate, 0.100 ml of the specimen is required.

REAGENT PREPARATION

- 1. Wash Buffer:**
Dilute contents of wash concentrate to 1000ml with distilled or deionized water in a suitable storage container. Store at room temperature 20-27°C for up to 60 days.
- 2. Working Substrate Solution:**
Pour the contents of the amber vial labeled Solution 'A' into the clear vial labeled Solution 'B'. Place the yellow cap on the clear vial for easy identification. Mix and label accordingly. Store at 2-8°C.
Note: Do not use the working substrate if it looks blue.

TEST PROCEDURE

(before proceeding with the assay, bring all reagents serum references and controls to room temperature (20-27°C).

1. Format the microplate wells for each serum reference, control and patient specimen to be assayed in duplicate. **Replace any unused microwell strips back into the aluminum bag, seal and store at 2-8°C.**
2. Pipette 0.050 ml (50µl) of the appropriate serum reference, control or specimen into the assigned well.
3. Add 0.100 ml (100µl) of FSH Enzyme Reagent solution to all wells.
4. Seal the microplate gently for 20-30 seconds to mix and cover.
5. Incubate 60 minutes at room temperature.
6. Decant the contents of the microplate by decantation or aspiration. If decanting, blot the plate dry with absorbent paper.
7. Add 250µl of wash buffer (see Reagent Preparation Section) around (top and bottom) aspirate. Repeat two (2) additional times for a total of three (3) washes. An automatic or manual plate washer can be used. Follow the manufacturer's instruction for proper usage. If a squeeze bottle is employed, fill each well by depressing the container (avoiding air bubbles) to dispense the wash. Decant the wash and repeat two (2) additional times.
8. Add 0.100 ml (100µl) of working substrate solution to all wells (see Reagent Preparation Section). **Always add reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells.**
DO NOT SHAKE THE PLATE AFTER SUBSTRATE ADDITION.
9. Incubate at room temperature for fifteen (15) minutes.
10. Add 0.050ml (50µl) of stop solution to each well and gently mix for 15-20 seconds. **Always add reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells.**
11. Read the absorbance in each well at 450nm using a reference wavelength of 620-630nm to monitor well uniformity in a microplate reader. **The results should be read within thirty (30) minutes of adding the stop solution.**

QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at levels in the low, normal and elevated range for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Patient statistical methods should be employed to ascertain trends. Significant deviation from qualitative performance can indicate unexplained change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variation.

CALCULATION OF RESULTS

A dose response curve is used to ascertain the concentration of follicle stimulating hormone in unknown specimens.

1. Record the absorbance obtained from the printed of the microplate reader as outlined in Example 1.
2. Plot the absorbance for each duplicate serum reference versus the corresponding FSH concentration in mIU/ml on linear graph paper (do not average the duplicates of the serum references before plotting).
3. Draw the best fit curve through the plotted points.
4. To determine the concentration of FSH for an unknown, locate the average absorbance of the duplicates for each unknown on the vertical axis of the graph, find the intersecting point on the curve, and read the concentration in mIU/ml from the horizontal axis of the graph (the duplicates of the unknown may be averaged as indicated); in the following example, the average absorbance (1.214) intersects the dose response curve at 43.2ml/25ml FSH concentration (See Figure 1).

Inhibin B Gen II ELISA

RUD FOR RESEARCH USE ONLY

Not for use in diagnostic procedures.

INTENDED USE

The Inhibin B Gen II enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit provides materials for the quantitative measurement of inhibin B in human serum and lithium heparin plasma.

SUMMARY AND EXPLANATION

Inhibins are heterodimeric polypeptide hormones. They selectively suppress the secretion of pituitary follicle stimulating hormone (FSH) and also have local paracrine actions on the gonads.^{1,2} The fully processed form of the inhibin molecule has a molecular weight of approximately 32-36 kD and consists of the two distinct chains (α and β), linked by disulfide bridges. Higher molecular weight forms, with precursor forms of the α -subunit, also occur in follicular fluid and serum. In addition, free α -subunit forms, unassociated with a β -subunit, and lacking inhibin bioactivity, are also present.^{3,4,5,6} Inhibin B consists of an α -subunit and a β -subunit. Inhibin B is produced by the sertoli cells of the testis in the male and the granulosa cells of the ovary in the female. Its primary role appears to be in the regulation of gametogenesis via negative feedback on the production of FSH. Several published reports indicate the utility of measurement of inhibin B as an endocrine marker for monitoring the male^{7,8,9,10,11,12} and female^{13,14,15,16,17,18,19,20,21} gonadal function. The Inhibin B Gen II ELISA uses the highly characterized pair of antibodies that specifically recognize only the functional dimeric inhibin B molecule and does not measure the free α -subunit forms present in biological fluids.²² The current assay does not require sample pre-treatment step with hydrogen peroxide to oxidize two methionines in the epitope to the sulfoxide for full immunoreactivity.

PRINCIPLE OF THE TEST

The Inhibin B Gen II ELISA is an enzymatically amplified three-step "sandwich" assay. In the assay, calibrators, controls and samples are incubated in microtitration wells which have been coated with anti-activin B antibody.²² After incubation and washing, the wells are incubated with biotinylated anti-Inhibin α -subunit detection antibody. After a second incubation and washing step, the wells are incubated with streptavidin labelled with the enzyme horseradish peroxidase (HRP). After a third incubation and washing step, the wells are incubated with the substrate tetramethylbenzidine (TMB). After incubation an acidic stopping solution is added. The degree of enzymatic turnover of the substrate is determined by dual wavelength absorbance measurement at 450 nm as primary test filter and 630 nm as primary reference filter. The absorbance measured is directly proportional to the concentration of inhibin B in the samples. A set of Inhibin B Gen II calibrators is used to plot a calibration curve of absorbance versus inhibin concentration. The inhibin B concentrations in the samples can then be calculated from this calibration curve.

MATERIALS SUPPLIED

AD|PLATE Inhibin B Gen II Antibody Coated Microtitration strips:
A94978

- One strip holder, containing 96 polystyrene microtitration wells with mouse monoclonal anti-activin B antibody immobilized to the inside wall of each well.
- Store at 2 to 8°C until expiration date in the resealable pouch with a desiccant to protect from moisture.

BIO|CONJ|CONC Inhibin B Gen II Antibody-Biotin Conjugate Concentrate:
A94979

- One vial, 0.4 mL, containing a solution of biotinylated anti-inhibin α -subunit antibody in buffer with protein (mouse), < 0.5% ProClin* 300.
- Store at 2 to 8°C until expiration date.
- Dilute 10-30 minutes prior to use in Inhibin B Gen II Biotin Conjugate Diluent.

STREP|CONJ|RTU Streptavidin-Enzyme Conjugate:
A94980

- One bottle, 13 mL, containing conjugated HRP in buffer with protein (fish) and < 10% methanol.
- Store at 2 to 8°C until expiration date.
- Provided ready-to-use.

ASSAY|BUFFER Inhibin B Gen II Assay Buffer:
A94982

- One bottle, 8 mL, containing buffer with bovine serum albumin (BSA), protein (bovine, mouse, goat), surfactant and < 0.5% ProClin 300.
- Store at 2 to 8°C until expiration date.

CONJ|DIL Inhibin B Gen II Biotin Conjugate Diluent:
A94981

- One bottle, 13 mL, containing buffer with BSA, protein (bovine, mouse, goat), surfactant and < 0.5% ProClin 300.
- Store at 2 to 8°C until expiration date.

TMB|SOLN TMB Chromogen Solution:
DSL-10-9755

- One bottle, 11 mL, containing a solution of TMB in citrate buffer with hydrogen peroxide.
- Store at 2 to 8°C until expiration date.

WASH|CONC|B Wash Concentrate B:
DSL-10-9730

- One bottle, 60 mL, containing buffered saline with a nonionic detergent.
- Store at 2 to 8°C or room temperature (~25°C) until expiration date.
- Dilute 25-fold with deionized water prior to use.

STOP|SOLN|A Stopping Solution A:
DSL-10-9780

- One bottle, 11 mL, containing 0.2 M sulfuric acid.
- Store at 2 to 8°C or room temperature (~25°C) until expiration date.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

1. Inhibin B Gen II Calibrators and Controls A81302
2. Microtitration plate reader capable of absorbance measurement at 450/405 nm and preferentially capable of dual wavelength (reference filter) at 600 to 630 nm
3. Deionized water
4. Precision pipette(s) to deliver 10-1000 μ L
5. Microtitration plate shaker capable of 600-800 orbital revolutions per minute (rpm)
6. Microtitration plate washer
7. Vortex mixer
8. Absorbent materials for blotting the strips
9. Graph paper for manual data reduction

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
- Use good laboratory practices.²³
- Samples and blood-derived products may be routinely processed with minimum risk using the procedure described. However, handle these products as potentially infectious according to universal precautions and good clinical laboratory practices, regardless of their origin, treatment or prior certification.²⁴ Use an appropriate disinfectant for decontamination. Store and dispose of these materials and their containers in accordance with local regulations and guidelines.

Caution

- Sodium azide preservative may form explosive compounds in metal drain lines. See NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (8/16/76). To avoid the possible build-up of azide compounds, flush wastepipes with water after the disposal of undiluted reagent. Sodium azide disposal must be in accordance with appropriate local regulations.

Assay Buffer



WARNING

H317 May cause an allergic skin reaction.
H319 Causes serious eye irritation.
P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.
P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
P337+P313 If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
P362+P364 Take off contaminated clothing and wash it before use.
octylphenoxypoly(ethoxyethanol) 1 - 2%
reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 220-239-6](3:1) < 0.05%

Biotin Conjugate Diluent



WARNING

H317 May cause an allergic skin reaction.
H319 Causes serious eye irritation.
P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.
P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
P337+P313 If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
P362+P364 Take off contaminated clothing and wash it before use.
octylphenoxypoly(ethoxyethanol) 1 - 2%
reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 220-239-6](3:1) < 0.05%

AB Biotin Conjugate Concentrate



DANGER

H317 May cause an allergic skin reaction.
H318 Causes serious eye damage.
P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.
P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P310 Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.
P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
P362+P364 Take off contaminated clothing and wash it before use.
octylphenoxypoly(ethoxyethanol) 1 - 5%
reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 220-239-6](3:1) < 0.05%



Streptavidin Conjugate RTU



DANGER

H226 Flammable liquid and vapour.
H302 Harmful if swallowed.
H313 May be harmful In contact with skin
H370 Causes damage to organs.
P210 Keep away from heat, hot surfaces, and sparks. No smoking.
P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.
P308+P311 If exposed or concerned: Call a doctor/physician.
P312 Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.
Methanol 1 - 9%



Stopping Solution A



DANGER

H314 Causes severe skin burns and eye damage.
P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.
P301+P330+P331 IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
P303+P361+P353 IF ON SKIN (or hair): Rinse skin with water.
P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P310 Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.
Sulfuric Acid 1 - 3%

Xi: Irritant: < 0.5% ProClin 300.



R 43: May cause sensitization by skin contact.
S 37: Wear suitable gloves.
S 28: After contact with skin, wash immediately with plenty of soap and water.

Xn: Harmful: < 10% Methanol.



R 20/21/22: Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.
R 68: Possible risk of irreversible effects.
S 36/37: Wear suitable protective clothing and gloves.
S 45: In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

- SDS** The Safety Data Sheet (SDS) is available upon request or at techdocs.beckmancoulter.com

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

- Serum and lithium heparin plasma are the recommended samples.
- Observe the following recommendations for handling, processing and storing blood samples:²⁵
 - Collect all blood samples observing routine precautions for venipuncture.
 - Allow serum samples to clot completely before centrifugation.
 - Keep tubes stoppered at all times.
 - Within two hours after centrifugation, transfer at least 500 μ L of cell-free sample to a storage tube. Tightly stopper the tube immediately.
 - Store samples tightly stoppered at 2 to 8°C for no longer than 48 hours.
 - If the assay will not be completed within 48 hours, or for shipment of samples, freeze at -20°C.
- Use the following guidelines when preparing samples:
 - Ensure residual fibrin and cellular matter have been removed prior to analysis.
 - Follow blood collection tube manufacturer's recommendations for centrifugation.
- Each laboratory should determine the acceptability of its own blood collection tubes and serum separation products. Variations in these products may exist between manufacturers and, at times, from lot-to-lot.
- Avoid repeated freezing and thawing of samples.
- Avoid assaying lipemic or hemolyzed samples.

PROCEDURAL NOTES

- A thorough understanding of this package insert is necessary for successful use of the Inhibin B Gen II ELISA.
- It is the responsibility of the customer to validate the assay for their use.
- Reliable results will only be obtained by using precise laboratory techniques and accurately following the package insert.
- A calibration curve must be included with each assay.
- Bring all kit reagents to room temperature (~25°C) before use.
- Thoroughly mix the reagents before use by gentle inversion.

- Do not mix various lots of any kit component within an individual assay.
- Do not use any component beyond the expiration date shown on its label.
- Incomplete washing will adversely affect the outcome and assay precision.
- To minimize potential assay drift due to variation in the substrate incubation time, care should be taken to add the stopping solution into the wells in the same order and speed used to add the TMB chromogen solution.
- Avoid microbial contamination of reagents, especially of the conjugate and the assay buffer.
- Avoid contamination of the TMB chromogen solution with the conjugates.
- Use a clean disposable pipette tip for each reagent, calibrator, control or sample.
- For dispensing sulfuric acid and TMB chromogen solution, avoid pipettes with metal parts.
- The enzyme used as the label is inactivated by oxygen, and is highly sensitive to microbial contamination, sodium azide, hypochlorous acid and aromatic chlorohydrocarbons often found in laboratory water supplies.
- Use deionized water.
- Avoid exposure of the reagents to excessive heat or direct sunlight during storage and incubation.

TEST PROCEDURE

Preparation of Reagents

1. **Wash Solution:** Dilute 1 part Wash Concentrate B with 24 parts deionized water. The resulting working strength wash solution is stable for one month at room temperature (~25°C) when stored in a tightly sealed bottle.
2. **Inhibin B Gen II Antibody-Biotin Conjugate:** The Inhibin B Gen II Antibody-Biotin Conjugate Concentrate should be diluted at a ratio of 1 part into 50 parts of Inhibin B Gen II Biotin Conjugate Diluent, according to the number of wells used. For an entire plate, pipet exactly 220 µL of the concentrate into 11 mL of the Inhibin B Biotin Conjugate Diluent.
NOTE: The antibody-biotin conjugate concentrate should be freshly diluted 10–30 minutes prior to use.
3. **Microtitration Wells:** Select the number of coated wells required for the assay. The remaining unused wells should be placed in the resealable pouch with a desiccant. The pouch must be resealed to protect from moisture.

Assay Procedure

Allow all samples and reagents to reach room temperature (~25°C). Mix reagents thoroughly by gentle inversion before use. After reconstitution of reagents, mix thoroughly, avoiding foam. Calibrators, controls and samples should be assayed in duplicate.

1. Mark the microtitration strips to be used.
2. Pipet 50 µL of the calibrators, controls and samples to the appropriate wells.
3. Add 50 µL of the Inhibin B Gen II Assay Buffer to each well using a precision pipette.
4. Incubate the wells, shaking at 600–800 rpm on an orbital microplate shaker, for two hours at room temperature (~25°C).
5. During the last 10–30 minutes of incubation, prepare the Inhibin B Gen II antibody-biotin conjugate solution by diluting the Inhibin B Gen II Biotin Conjugate Concentrate in Inhibin B Biotin Conjugate Diluent as described under the "Preparation of Reagents" section of this package insert.
6. Aspirate and wash each well five times with the wash solution using an automatic microplate washer or manually using a precision pipette. Blot dry by inverting plate on absorbent material.
NOTE: Use of an automatic microplate washer is strongly recommended. Incomplete washing will adversely affect assay precision. If a microplate washer is not available, follow these steps to wash the plate manually:
 - (a) Completely aspirate the liquid from each well
 - (b) Dispense 350 µL of the wash solution into each well using a precision pipette
 - (c) Aspirate the liquid again
 - (d) Repeat steps (b) and (c) four times
7. Add 100 µL of the Inhibin B Gen II antibody-biotin conjugate solution to each well using a precision pipette.

8. Incubate the wells, shaking at 600–800 rpm on an orbital microplate shaker, for 60 minutes at room temperature (~25°C).
9. Aspirate and wash each well five times with the wash solution using an automatic microplate washer. Blot dry by inverting plate on absorbent material.
10. Add 100 µL of the Inhibin B Gen II Streptavidin-Enzyme Conjugate solution to each well using a precision pipette.
11. Incubate the wells, shaking at 600–800 rpm on an orbital microplate shaker, for 8–12 minutes at room temperature (~25°C).
12. Aspirate and wash each well five (5) times with the wash solution using an automatic microplate washer. Blot dry by inverting plate on absorbent material.
13. Add 100 µL of the TMB chromogen solution to each well using a precision pipette.

Avoid exposure to direct sunlight.

14. Incubate the wells, shaking at 600–800 rpm on an orbital microplate shaker, for 8–12 minutes at room temperature (~25°C).
NOTE: Be aware that the color may develop more quickly or more slowly than the recommended incubation time depending on the localized room temperature. Visually monitor the color development to optimize the incubation time.

15. Add 100 µL of the stopping solution to each well using a precision pipette.
16. Read the absorbance of the solution in the wells within 30 minutes, using a microplate reader set to 450 nm.

- NOTE:**
- 1) While reading the absorbance of the microtitration well, it is necessary to program the zero calibrator as a "Blank".
 - 2) If wavelength correction is available, set the instrument to dual wavelength measurement at 450 nm with background wavelength correction set between 600 and 630 nm.

RESULTS

1. Calculate the mean absorbance for each calibrator, control or sample.
2. Subtract the mean absorbance of Calibrator A (blank) from the mean absorbance of calibrators B-G, controls and samples. Plot the log of the mean blank-subtracted absorbance readings for calibrators B-G along the y-axis versus log of the inhibin B concentrations in pg/mL along the x-axis, using a cubic regression curve-fit. Alternatively, the data can be plotted log vs. log and a linear curve-fit can be used.
3. Determine the inhibin B concentrations of the controls and samples from the calibration curve by matching their mean absorbance readings with the corresponding inhibin B concentrations.
4. Any sample reading higher than the highest calibrator should be appropriately diluted using 0 pg/mL Calibrator A and reassayed.
5. Any sample reading lower than the analytical sensitivity should be reported as such.
6. Multiply the value by a dilution factor, if required.

NOTE: If the absorbance readings exceed the limitations of the plate reader, a second reading at 405 nm is needed (reference filter between 600 and 630 nm if available). In this case, proceed to construct a second calibration curve as above with the absorbance readings of all calibrators at 405 nm. The concentration of the off-scale samples at 450 nm is then read from the new calibration curve. The readings at 405 nm should not replace the on-scale readings at 450 nm.

LIMITATIONS

- The reagents supplied in this kit are optimized to measure inhibin B levels in serum and lithium heparin plasma.
- For assays employing antibodies, the possibility exists for interference by heterophile antibodies in the sample. Samples from individuals which have been regularly exposed to animals or have received immunotherapy or diagnostic procedures utilizing immunoglobulins or immunoglobulin fragments may produce antibodies, e.g. HAMA, that interfere with immunoassays. Additionally, other heterophile antibodies such as human anti-goat antibodies may be present in samples.^{26,27}
- If there is evidence of microbial contamination or excessive turbidity in a reagent, discard the vial.

QUALITY CONTROL

- Each laboratory should establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.
- Inhibin B Gen II ELISA controls or other commercial controls should fall within established confidence limits.
- The confidence limits for Inhibin B Gen II ELISA controls are provided with the Inhibin B Gen II Calibrator and Control kit.
- A full calibration curve, plus low and high level controls, should be included in each assay.
- The TMB chromogen solution should be colorless to very light yellow. Development of a blue color may indicate reagent contamination or instability.

REPRESENTATIVE CALIBRATION CURVE DATA

WELL NO.	WELL CONTENTS	MEAN ABSORBANCE	CONC. (pg/mL)
A1, A2	A	(BLANK)	0
B1, B2	B	0.05	10
C1, C2	C	0.14	30
D1, D2	D	0.50	100
E1, E2	E	1.19	250
F1, F2	F	2.08	500
G1, G2	G	3.18	1000

CAUTION: The above data must not be employed in lieu of data obtained by the user in the laboratory.

REFERENCES

- 1 Muttukrishna S, Ledger W, eds. 2001. Inhibin, activin and follistatin in human reproductive physiology. Imperial College Press, London, UK.
- 2 Welt C, Sidis Y, Keutmann, H, Schneyer A. 2002. Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp Biol Med* 227:724-752.
- 3 Knight PG, Beard AJ, Wrathall HM, Castillo RJ. 1989. Evidence that the bovine ovary secretes large amounts of monomeric inhibin alpha subunit and its isolation from bovine follicular fluid. *J Mol Endocrinol* 2:189-200.
- 4 Schneyer AL, Sluss PM, Whitcomb RW, Martin KA, Sprengel R, Crowley WF Jr. 1991. Precursors of alpha-inhibin modulate FSH receptor binding and biological activity. *Endocrinology* 129:1987-1999.
- 5 Robertson DM, Sullivan J, Watson M, Cahir N. 1995. Inhibin forms in human plasma. *J Endocrinol* 144:261-269.
- 6 Robertson D, Burger HG, Sullivan J, Cahir N, Groome N, Poncelet E, Franchimont P, Woodruff T, Mather JP. 1996. Biological and immunological characterization of inhibin forms in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 81:669-676.
- 7 Groome NP, Evans LW. 2000. Does measurement of inhibin have a clinical role? *Ann Clin Biochem.* 37:419-431.
- 8 Burger HG, Robertson DM. 1997. Editorial: inhibin in the male - progress at last. *Endocrinology* 138:1361-1362.
- 9 Klingmuller D, Haidl G. 1997. Inhibin B in men with normal and disturbed spermatogenesis. *Hum Reprod* 12:2376-2378.
- 10 Pierik FH, Vreeburg JT, Stijnen T, De Jong FH, Weber RF. 1998. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3110-3114.
- 11 Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNeilly AS, Bremner WJ. 1996. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3341-3345.
- 12 Hayes FJ, Pitteloud N, DeCruz S, Crowley WF Jr, Boepple PA. 2001. Importance of inhibin B in the regulation of FSH secretion in the human male. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5541-5546.
- 13 Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, McNeilly AS. 1996. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1401-1405.
- 14 Lockwood GM, Muttukrishna S, Ledger WL. 1998. Inhibins and activins in human ovulation, conception and pregnancy. *Hum Reprod Update* 4:284-295.
- 15 Welt CK, McNicholl DJ, Taylor AE, Hall JE. 1999. Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. *J Clin Endocrinol Metab* 84:105-111.
- 16 Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Bert CA. 1997. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 67:110-114.
- 17 Seifer DB, Scott RT Jr, Bergh PA, Abrogast LK, Friedman CI, Mack CK, Danforth DR. 1999. Women with declining ovarian reserve may demonstrate a decrease in day 3 serum inhibin B before a rise in day 3 follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 72:63-65.
- 18 Dzik A, Lambert-Messerlian G, Izzo VM, Soares JB, Pinotti JA, Seifer DB. 2000. Inhibin B response to EFORT is associated with the outcome of oocyte retrieval in the subsequent in vitro fertilization cycle. *Fertil Steril* 74:1114-1117.
- 19 Danforth DR, Abrogast LK, Mroueh J, Kim MH, Kennard EA, Seifer DB, Friedman CI. 1998. Dimeric inhibin: a direct marker of ovarian aging. *Fertil Steril* 70:119-123.
- 20 Santoro N, Adel T, Skurnick JH. 1999. Decreased inhibin tone and increased activin A secretion characterize reproductive aging in women. *Fertil Steril* 71:658-662.
- 21 Tinkanen H, Bläuer M, Laippala P, Tuohimaa P, Kujansuu E. 2001. Correlation between serum inhibin B and other indicators of the ovarian function. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 94:109-113.
- 22 Ludlow H, Muttukrishna S, Hyvönen M, Groome NP. 2008. Development of a new antibody to the human inhibin/activin betaB subunit and its application to improved inhibin B ELISAs. *J Immunol Methods* 329:102-111.
- 23 Clinical Laboratory Safety; Approved Guideline Third Edition, GP17-A3. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 24 HHS Publication, 5th ed., December 2009. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Available <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15>
- 25 Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. Approved Guideline - H18-A3. 2004. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 26 Kricka L. 2000. Interferences in immunoassays - still a threat. *Clin Chem* 46: 1037-1038.
- 27 Bjerner J, Nustad K, Normu LF, Olsen KH, Børner OP. 2002. Immunometric assay interference: incidence and prevention. *Clin Chem* 48:613-621.

Beckman Coulter and the stylized logo are trademarks of Beckman Coulter, Inc. and are registered in the USPTO.

*ProClin is a registered trademark of Rohm and Haas Company or of its subsidiaries or affiliates.



Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.

Printed in U.S.A.
Made in U.S.A.
Revised March 2015

Fructose Test – 96 Tests

TEST PHOTOMETRIQUE DE QUANTIFICATION DU FRUCTOSE DANS LE PLASMA SEMINAL HUMAIN

REFERENCE DU DOCUMENT : FP09 I29 R01 B.8



MISE A JOUR : 27/09/2016

Le témoin de fructose contient 0,09 % d'azote de Na.

Réactif réservé à l'usage professionnel.

INFORMATIONS GÉNÉRALES

Le test Fructose vise à mesurer la quantité de fructose dans le sperme ou le plasma séminal humain. Le fructose du sperme est le reflet de la fonction sécrétoire des vésicules séminales. Le test Fructose peut contribuer à évaluer le diagnostic et la prise en charge de la stérilité masculine.

PRINCIPE DU TEST

Fructose + indole → *chaleur/acide* → complexe absorbant les longueurs d'onde de 470-492 nm

MATÉRIEL FOURNI DANS LE KIT

- Réactif 1 – Solution TCA 50 ml
- Réactif 2 – HCl concentré (32 %) 25 ml
- Réactif 3 – Indole 3 ml
- Réactif 4 – NaOH (0,5 M) 25 ml
- Témoin de fructose – 10 ml (5 mg/ml)

MATÉRIEL NON FOURNI DANS LE KIT

- Lecteur de plaques/Photomètre (avec filtre de 470-492 nm)
- Pipettes et embouts
- Tubes à centrifugation
- Plaque de titrage
- Centrifugeuse (> 1000 g)
- Petits tubes pour réactif ou tubes d'Eppendorf
- Bain-marie

MÉTHODE

1. Laisser l'échantillon de sperme se liquéfier à température ambiante
2. Mesurer le volume total de sperme (plasma) (au moyen d'une seringue stérile, p. ex.)
3. Pipetter 100 µl de l'échantillon de sperme/plasma séminal dans des tubes à essai séparés
4. Pipetter 100 µl de témoins de fructose (voir ci-dessous comment préparer les témoins) dans un tube à essai et traiter comme un échantillon de sperme
5. Ajouter 0,5 ml de réactif 1 aux échantillons (et aux témoins) et mélanger
6. Centrifuger pendant 10 minutes à 1 000 g ou plus
7. Pipetter 20 µl de surnageant/témoin de l'étape 5 dans un petit tube pour réactif ou un tube d'Eppendorf vide
8. Échantillon témoin : pipetter 20 µl d'eau purifiée dans un petit tube pour réactif ou un tube d'Eppendorf vide
9. Ajouter 200 µl de réactif 2 dans chacun des tubes
- Remarque:** Effectuez l'étape 10-13 sous une hotte comme réactif 3 est toxique par inhalation (voir mises en garde et précautions)
10. Ajouter 20 µl de réactif 3 (indole) dans chacun des tubes
11. Fermer ou sceller les tubes et incuber pendant 30 minutes à 37 °C au bain-marie ou 60 minutes à 37 °C dans un incubateur à sec
12. Ajouter 200 µl de réactif 4 pour arrêter la réaction de coloration.
13. Pipetter 200 µl d'échantillon dans un puits vide et lire les résultats à 470-492 nm dans un lecteur de plaques

TÉMOINS DE FRUCTOSE

Le kit contient une solution de fructose à 5 mg/ml. Préparer une courbe témoin avec les concentrations de fructose suivantes :

Témoin	Fructose	Eau
5 mg/ml	100 µl	0 µl
2,5 mg/ml	50 µl	50 µl
1 mg/ml	20 µl	80 µl

Remarque: préparer les dilutions du témoin avec de l'eau purifiée (eau distillée, p. ex.).

INTERPRÉTATION

La valeur mesurée (DO) pour l'échantillon est placée sur le graphique pour la comparer à la courbe témoin (en utilisant les 3 témoins mentionnés plus haut), en plaçant la DO sur l'axe des Y et la concentration en fructose sur l'axe des X.

Pour obtenir les quantités totales de fructose, multiplier le résultat par le volume total de l'échantillon de sperme ou de plasma séminal.

Valeurs normales selon le manuel de l'OMS :

- 2,4 mg/éjaculat ou plus
- 13 µmol/éjaculat ou plus

Remarque : la courbe témoin descend de façon linéaire jusqu'à 0,5 mg/ml ; les quantités inférieures de fructose ne peuvent être mesurées avec précision avec ce kit.

Une faible concentration en fructose dans le sperme peut révéler une obstruction des canaux éjaculateurs, une absence congénitale bilatérale du canal déférent, une éjaculation rétrograde partielle ou une carence androgénique (OMS, 2010).

CONSERVATION

Le produit est stable après transport (maximum 5 jours) à température élevée (≤ 37°C). Conserver les réactifs entre 2 °C et 8 °C. Garder à l'abri de la lumière. Le produit peut être utilisé pendant 12 mois après la date de production.

Le flacon contenant le réactif 2 (HCl) peut montrer une légère variation de couleur vers l'orange ou le rose (le liquide reste incolore), qui n'influe pas sur les résultats du test.

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Réactif 1 (solution de TCA): Provoque des brûlures graves. Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un médecin. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.

Réactif 2 (solution d'HCl à 32 %) : Provoque des brûlures. Irritant pour les voies respiratoires. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un médecin. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin. Ne jamais ajouter d'eau à l'HCl concentré.

Réactif 3 (Indole dans méthanol): Nocif si ingéré. Éviter tout contact avec la peau et les yeux. Hautement inflammable. Toxique par inhalation et par ingestion. **Toujours travailler sous une hotte lors de l'utilisation de ce réactif.**

Réactif 4 (NaOH): Provoque des brûlures. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un médecin. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.

L'ensemble du matériel organique humain doit être considéré comme potentiellement infectieux. Manipuler tous les échantillons dans les conditions prévues pour les agents susceptibles de transmettre le VIH ou l'hépatite. Toujours porter des vêtements de protection lors de la manipulation des échantillons et du réactif (gants, blouse de laboratoire, protection oculaire/du visage).

CALCUL DES FORCES G

La force g de votre centrifugeuse peut être calculée au moyen de la formule suivante :

$$g = 1,118 \times r \times \text{tpm}^2 \quad \text{ou} \quad \text{tpm} = \text{racine carrée} \{g/(1,118 \times r)\}$$

r = rayon de la centrifugeuse en mm

tpm = tours par minutes/1000

Ex. 1

$$r = 100 \text{ mm} \quad \text{tpm} = 3 \text{ 000 tours par minute}$$

$$g = 1,118 \times 100 \times 9 = \underline{1 \text{ 006 g}}$$

Ex. 2

$$r = 100 \text{ mm} \quad g = 1 \text{ 200 g}$$

$$\text{tpm} = \text{RC} \{1 \text{ 200}/(1,118 \times 100)\} = 3,28$$

$$= \underline{3 \text{ 280 tours par minute}}$$

BIBLIOGRAPHIE

WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen - 5th Edition. World Health Organization, 2010

FertiPro N.V.
Industriepark Noord 32
8730 Beernem - Belgique
E-mail : info@fertipro.com
URL : http://www.fertipro.com



**ANNEXES 3 : MATERIEL, REACTIFS ET
COURBES D'ETALONNAGE**

Matériel

- Centrifugeuse (*Human* N° serie : 02/3611)
- Chaîne *ELISA* (*Human REF 18460* N° serie : 590195)
- Congélateur
- Tubes pour prélèvements sanguins (Sec)
- Aiguilles vacutenaies et seringues
- Corps de pompe
- Garrot
- Bandes collantes
- Boîtes de sécurité et poubelles
- Micropipettes (*Human&Eppendorf*)
- Epruvette de 50 ml
- Pipette en verre de 5 ml
- Minuterie
- Crayons gras
- Papier aluminium
- Un plateau pour ranger le matériel
- Une alèze
- Un haricot
- Du dakin pour nettoyer le haricot entre deux prélèvements
- Un portoir à tubes
- Une poubelle pour élimination des déchets
- Coton/ Alcool
- Gants à usage unique
- Kit réactifs *ELISA* (HBV)
- TDR de l'hépatite B
- Eau de robinet
- Pot stérile
- Compresse stérile
- Eau distillée stérile
- Solution de darkin
- Poubelle
- Boîte de transport

- Lecteur de plaques/Photomètre (avec filtre de 470-492 nm)
- Pipettes et embouts
- Tubes à centrifugation
- Plaque de titrage
- Centrifugeuse (> 1000 g)
- Petits tubes pour réactif ou tubes d'Eppendorf
- Bain-marie
- Calibrateurs et contrôles Inhibin B Gen II A81302
- Lecteur de plaques de microtitration
- Eau déminéralisée
- Pipette de précision
- Agitateur de plaque de microtitration
- Mélangeur Vortex
- Matériau absorbant pour éponger les bandes
- Papier graphique pour la réduction manuelle des données

Réactifs

- **Géloses :**
 - Gélose au sang cuit (chocolat)
 - Chocolat + VCN
 - Mac Conkey
 - Chapman
 - EMB
 - BCP
 - Gélose au sang frais
 - Sabouraud au chloramphénicol
- Eau physiologique
- Eau distillée
- Urée indole (prêt à l'emploi),
- Galerie classique ID°Pasteur
- Galerie API 20E et API 20NE
- Eau oxygénée (catalase)
- Kit pour groupage des streptocoques
- **Réactif de Gornall A**

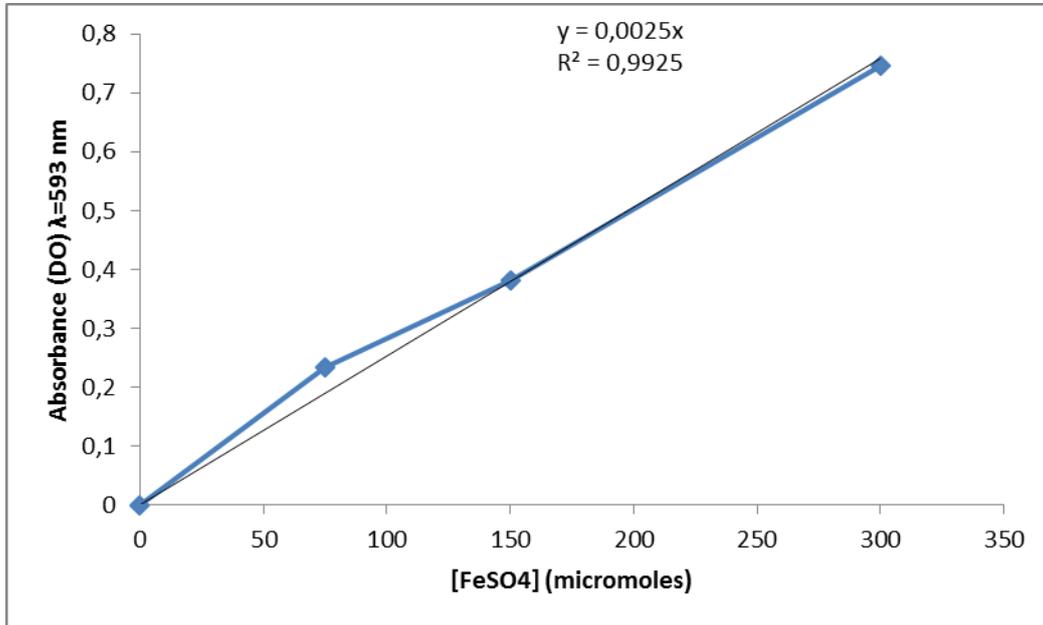
- $\text{Cu}_2\text{SO}_4, 5 \text{ H}_2\text{O}$: 0,6 g
- H_2SO_4 6,9 M : 0,1 ml
- Eau distillée QSP : 10 ml
- **Réactif de Gornall B**
- Tartrate double de sodium et de potassium : 1,8 g
- Soude : 1,6 g
- Iodure de potassium : 1 g
- Eau distillée QSP : 10 ml
- **Réactif de Biuret** : Au moment de l'emploi, mélanger 1 ml de solution A avec 1 ml de solution B et 18 ml d'eau distillée.
- **R1- Naphthylethylendiamide dihydrochloride (0,1%)**
- Naphthylethylendiamide dihydrochloride : 100 mg
- Eau distillée QFS : 100 ml
- **R2- sulfanilamide (1%) dans H_3PO_4 (5%) concentrâtes**
- Sulfanilamide: 1g
- H_3PO_4 (5%): 100 ml

Mixed R1 and R2 (1V:1V) to obtain the Greiss reagent

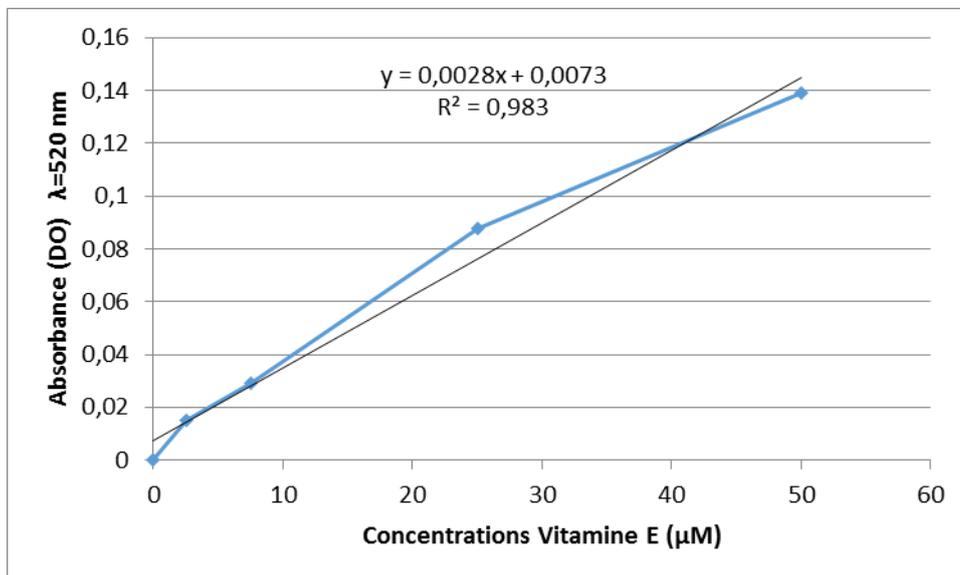
- Solution TCA 50 ml
- HCl concentré (32 %) 25 ml
- Indole 3 ml
- NaOH (0,5 M) 25 ml
- Témoin de fructose – 10 ml (5 mg/ml)
- Le réactif FOX1 : préparé avec 100 μmol /l d'orange de xylénol, 4 mmol /l d'hydroxytoluène butylé (BHT), 25 mM d'acide sulfurique et 250 μmol / l de sulfate ferreux d'ammonium dans une solution méthanol: eau (9: 1 v / v).

Courbes d'étalonnage

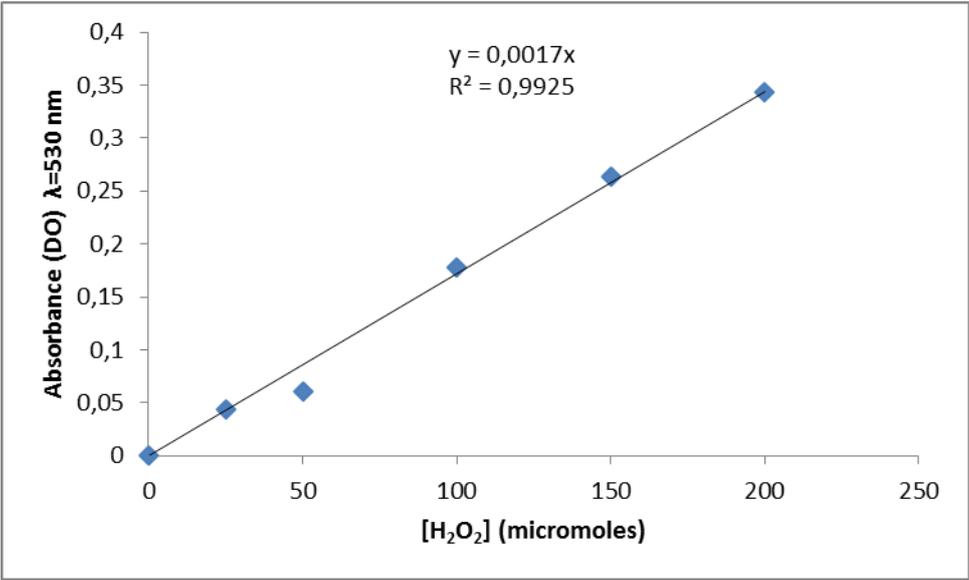
Capacité antioxydante totale



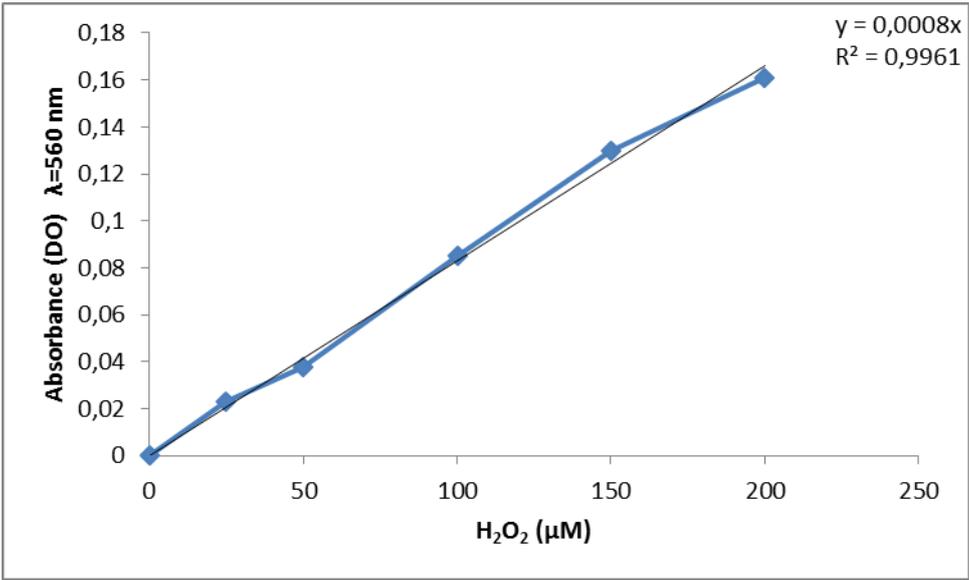
Vitamine E



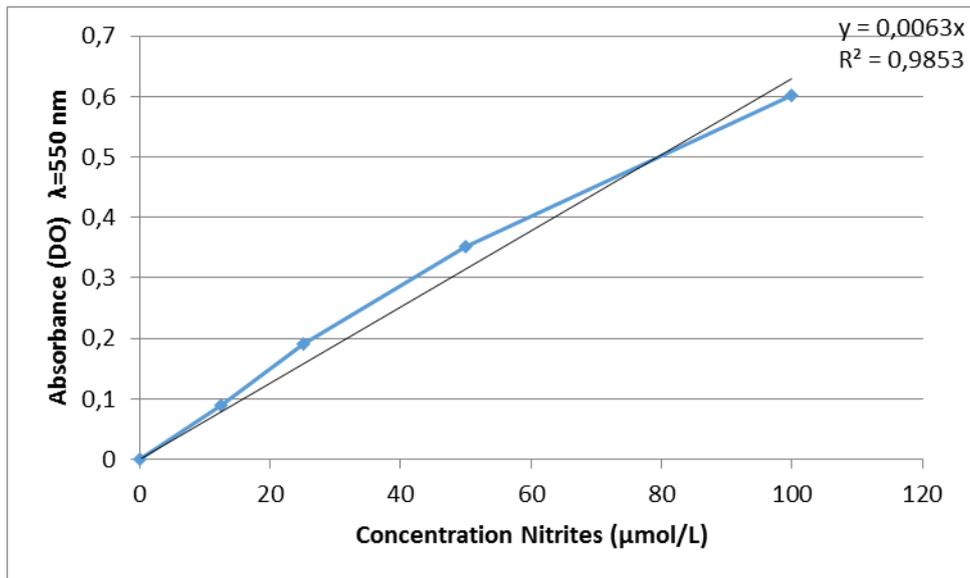
Catalase



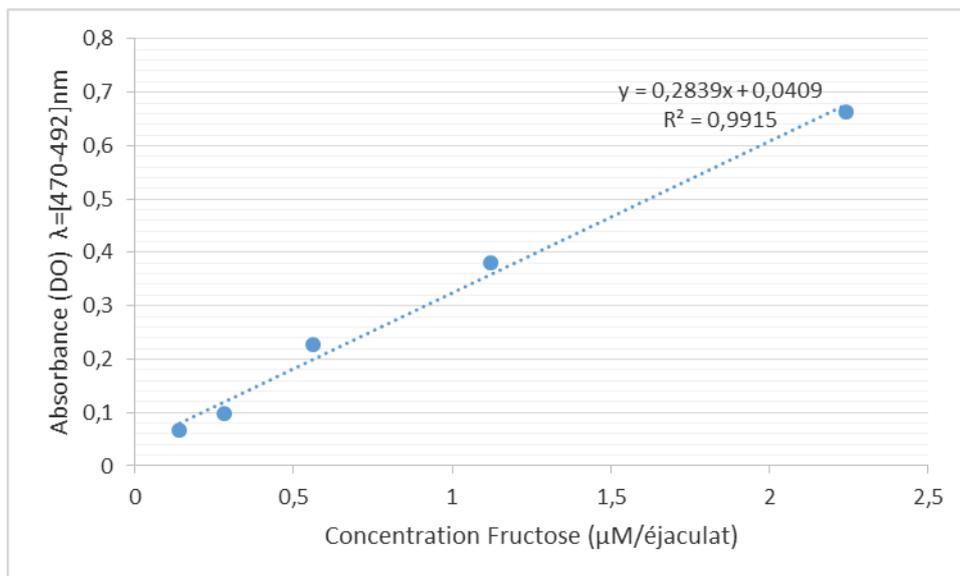
Peroxyde total



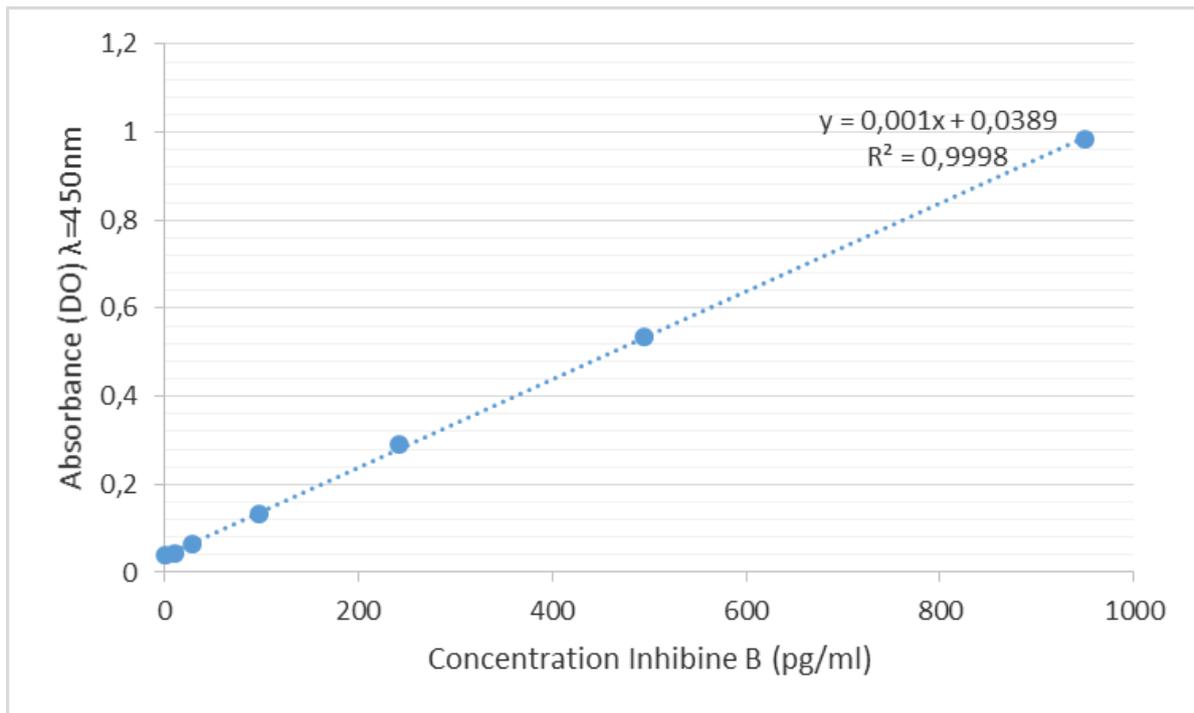
Nitrites



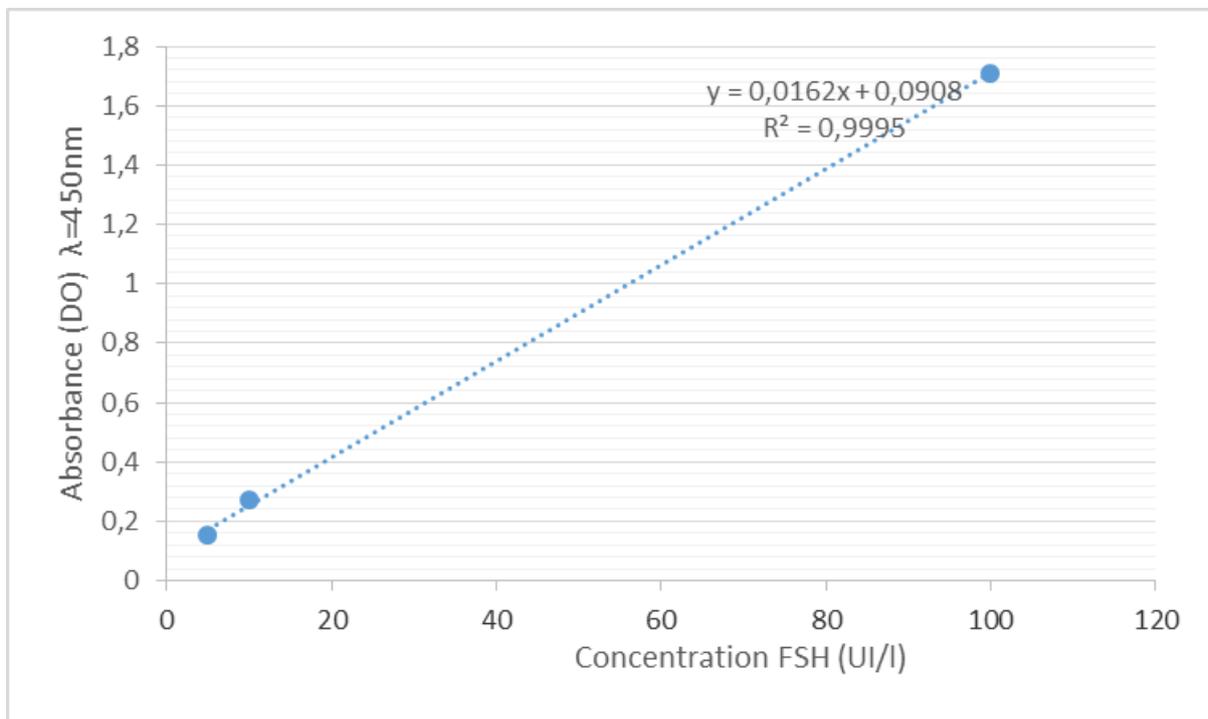
Fructose



Inhibine B



FSH



ANNEXES 4 : ARTICLES

Research Article

Comparison of Serum Inhibin B and Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Level between Normal and Infertile Men in Yaoundé

Tchoula Mamiafo Corinne ¹, Pieme Constant Anatole,² and Ngogang Yonkeu Jeanne²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, PB 812 Yaoundé, Cameroon

²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaoundé I, PB 1364 Yaoundé, Cameroon

Correspondence should be addressed to Tchoula Mamiafo Corinne; tchoulacorinne@yahoo.fr

Received 10 April 2019; Revised 8 August 2019; Accepted 24 August 2019; Published 25 January 2020

Academic Editor: Yuksel Agca

Copyright © 2020 Tchoula Mamiafo Corinne et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Objective. Hormones play a vital role in initiating and maintaining male reproductive function. The present study explores the influence and predictive ability of two reproductive hormones on semen quality among men who were partners in an infertile couple. **Design.** During our cross sectional study, men were recruited from private and public hospital and laboratories for clinical evaluation of fertility status. **Methods.** Fresh semen samples were assessed for quality (concentration, motility and morphology) according to the 2010 World Health Organization manual and the serum levels of hormones, including follicle-stimulating hormone (FSH), Inhibin B was measured (ELISA). **Results.** We found a significant difference in the two groups regarding sperm concentration ($p < 0.0001$), total sperm count ($p < 0.0001$), progressive motility ($p < 0.0001$), vitality ($p < 0.0001$) and the percentage of normal forms ($p = 0.043$). We found a strong and negative correlation between FSH and Inhibin B in the overall population, the normozoospermic reference group and the case group. Our study confirmed that Inhibin B was significantly and positively correlated with sperm concentration and leucocytes, and that FSH was negatively correlated to sperm concentration and vitality. **Conclusion.** Consistent with other studies, our results show strong association between semen quality and FSH and Inhibin B.

1. Introduction

Male infertility is found in 50% of infertile couples [1]. When reviewed, 55% of the reasons for infertility are found to be male-related and 35% to be female-related, while 10% constitutes infertility of unknown origin [2].

The etiology of declining male fertility can be related to falling androgen levels, decreased sexual activity, alterations in sperm motility and morphology, and deterioration in sperm quality and DNA integrity [3].

Previous studies have reported that circulating levels of specific reproductive hormones in men are associated with semen quality parameters [4]. In particular, Inhibin B and follicle-stimulating hormone (FSH) are thought to be markers of spermatogenesis and Sertoli cell function, and it has even been suggested that measuring the two hormones in serum could serve as a substitute for measuring semen quality or fecundability in epidemiologic studies [4].

Inhibin B is a heterodimeric glycoprotein composed of a common α -subunit and a specific β B-subunit [5]. In men, this protein is produced exclusively by the testis [5]. Inhibin B production is stimulated by the secretion of pituitary follicle-stimulating hormone (FSH). The resulting Inhibin B exerts a negative feedback on FSH secretion. Inhibin B also exerts a paracrine intratesticular effect [5]. The assessment of testicular function typically involves an initial endocrine assessment, in which serum FSH and total testosterone levels are routinely measured [6, 7]. When measured, Inhibin B levels correlate quite well with FSH concentrations in the vast majority of cases. However, the diagnostic accuracy of FSH is limited by the fact that some conditions do not lead to changes in FSH secretion [5]. FSH and Inhibin B are complementary tools in gonadal male conditions and andrological diagnostics [5, 8]. In particular, FSH and Inhibin B together are more sensitive than either alone in predicting the histological status of the testis and the presence of sperm in bioptic tissue [5].

This study is designed to study levels of follicle-stimulating hormone (FSH), and Inhibin B in blood serum, and their relation to seminal fluid functional parameters in a group of infertile patients.

2. Material and Methods

2.1. Subject Recruitment. The study population comprised healthy men referred for semen analysis to some private laboratories and health institutions. Our men subjects were members of infertile and fertile couples. For a given individual, the semen and blood samples were provided on the same day. All the participants gave their written informed consent.

2.2. Study Design. This cross-sectional study was carried out at six Public health institutions and Private laboratories of the Yaoundé Town. These centers are located in the political capital of Cameroon, and receive a large number of male patients living in Yaoundé and surrounding towns. A convenient sample of 240 infertile male patients, aged 18 years and above, were consecutively enrolled in the study during twelve months. But only 156 succeeded in providing both semen and blood samples. All the procedures used in this study were in accordance with the current revision of the Helsinki Declaration. A written and signed informed consent was provided by all the subjects. Consent forms and procedures, as well as survey protocol, were approved by the Cameroon National Ethics Committee (Reference number: 2015/04/572/CE/CNERSH/SP).

2.3. Interview Data. At enrollment standardized data collection forms were completed, including sociodemographic characteristics, the medical background, previous unions, surgical background, and sexuality.

2.4. Collection of Semen Samples. Semen was collected by masturbation into a sterile plastic specimen cup at the hospital or laboratory. Subjects were instructed to abstain from ejaculation for at least 72 hours prior to producing the semen sample. The actual abstinence period was recorded based on the information given by men at the time of the semen collection. The sample was liquefied for at least 30 minutes at 37°C, but no longer than 1 hour prior to performing a routine semen analysis, which included measurements of volume, pH, sperm concentration, sperm motility, progressive motility, and sperm morphology according to standard methodologies [9].

2.5. Evaluation of the Quality of Sperm. Before starting semen analysis, a period of time must be allowed for liquefaction. The normal liquefaction time is 30 minutes. If this is not done within this time, we will say that it is slow rather than normal. The semen volume, total sperm number, sperm concentration, motility, and vitality were interpreted according to the 2010 WHO guidelines.

Strict scoring criteria were used to classify men as having normal or subnormal morphology [9] as recommended by WHO guidelines. Kruger's classification identifies a single sperm anomaly. The anomaly is listed in order of importance

as follows: acrosome, head, intermediate piece and flagella. As soon as an abnormality is identified, the spermatozoon is directly classified as "abnormal".

2.6. Determination of Biochemical Parameters. Venous blood samples were taken from the cubital vein. The samples were left for 30 min at room temperature, then centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes at room temperature. The sera were transported to small Eppendorf tubes and stored at -20°C. The serum Inhibin B was determined in duplicate using the Inhibin B Gen II ELISA technique of Beckman Coulter (250 S. Kraemer Blvd. Brea, CA 92821 U.S.A.) which is an enzymatically amplified three-step "sandwich" assay. In the assay, calibrators, controls and samples are incubated in microtitration wells which have been coated with anti-activin B antibody [10]. Serum FSH levels were measured with a Microplate Immunoenzymometric assay of Monobind Inc. (IEMA/ELISA) (100 North pointe Drive, Lake Forest, CA 92630 U.S.A.).

2.7. Statistical Analysis. Data were coded and entered in Excel 2013, then analyzed using XLSTAT 2014. Semen parameters and hormone levels were expressed as the median (5th-95th percentiles). The Mann-Whitney U test was used to compare the reference and case groups.

Relationships between hormone levels and semen parameters were analyzed using Spearman's correlation test.

The evaluation of the parameters is based on the World Health Organization criteria.

Different aspects of semen analysis are discussed, such as enumeration of spermatozoa, viability, Kruger classification and interpretation of results.

Normozoospermia (reference group) corresponded to a total sperm count ≥ 20 million/ejaculate, progressive motility $\geq 32\%$ (as defined in the 2010 WHO manual), and normal forms $\geq 15\%$ (as defined in our laboratory).

A p value < 0.05 was used to characterize significant results.

3. Results

3.1. Semen Characteristics and Hormone Level Distributions of the Study Population. We recruited a total of 240 men but only 156 of them actually provided blood and semen samples for analysis. Of these, 48 presented semen parameters within the reference limits and thus constituted the reference group (Normospermic). In contrast, 108 men presented at least one abnormal semen parameter (as defined above) and thus constituted the case group.

The mean age of our population was 37.101 ± 7.371 years and the majority classes were those aged 30-35 followed by those aged 40-45.

Our patients had on average one child and the type of infertility found was more secondary (53.846%).

Table 1 presents the semen characteristics and hormone level distributions of our population. We found a significant difference in the two groups regarding sperm concentration ($p < 0.0001$), total sperm count ($p < 0.0001$), progressive motility ($p < 0.0001$), vitality ($p < 0.0001$) and the percentage of normal forms ($p = 0.043$). No statistical difference has been

TABLE 1: Semen characteristics of the study population. Data are reported as the median (5th-95th percentiles). Comparison between the reference group and the case group was performed using a Mann-Whitney *U* test.

Characteristics of the population	Overall population	Reference group	Case group	Normal values	<i>p</i>
Age (years)	37 (26-50)	37.6 (27-49.6)	36.5 (23.8-48.8)	NA	0.385
Number of children	1 (0-4)	1 (0-4)	1 (0-5)	NA	0.471
Abstinence (days)	3 (2-6)	3 (2-6)	3 (3-7)	3-5 days	0.441
Semen volume (mL)	2.92 (0.96-5.5)	2.95 (0.72-5.6)	2.8 (1.2-4.46)	≥2 mL	0.923
pH	8.31 (7.5-9)	8.32 (7.6-9)	8.3 (7.5-9)	≥7.2	0.594
Viscosity	1 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-3)	0	0.431
Sperm concentration (million/mL)	14.8 (0.2-70.2)	10.8 (0.03-54.6)	39.6 (2.1-78.8)	≥20 × 10 ⁶ /l	<0.0001
Total sperm count (million/ejaculate)	33 (0-194.08)	12.42 (0-109.1)	122.12 (14.83-300.28)	≥40 × 10 ⁶	<0.0001
Progressive motility (%)	43.2 (2-76)	35.3 (0-72.6)	64 (45.6-80.6)	≥50%	<0.0001
Vitality (%)	53 (10.8-85.2)	45.8 (9.4-81.4)	72 (56.4-86.6)	≥50%	<0.0001
Normal forms (%)	85 (67-94)	84 (65.8-94)	87 (74.8-92.6)	≥85%	0.043

p < 0.05 was considered to be statistically significant. The significant values are *p* < 0.0001 and *p* = 0.043.

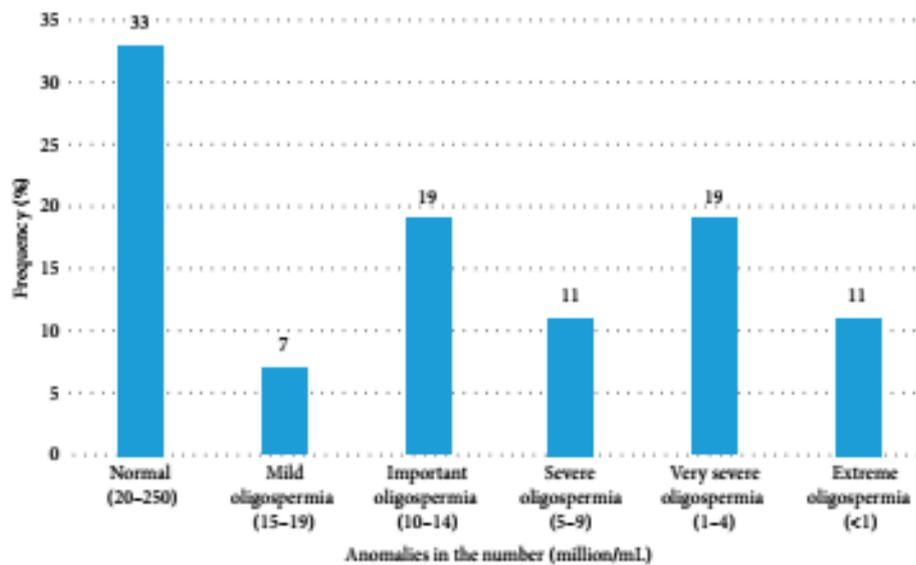


FIGURE 1: Distribution of the population according to anomalies in numbers.

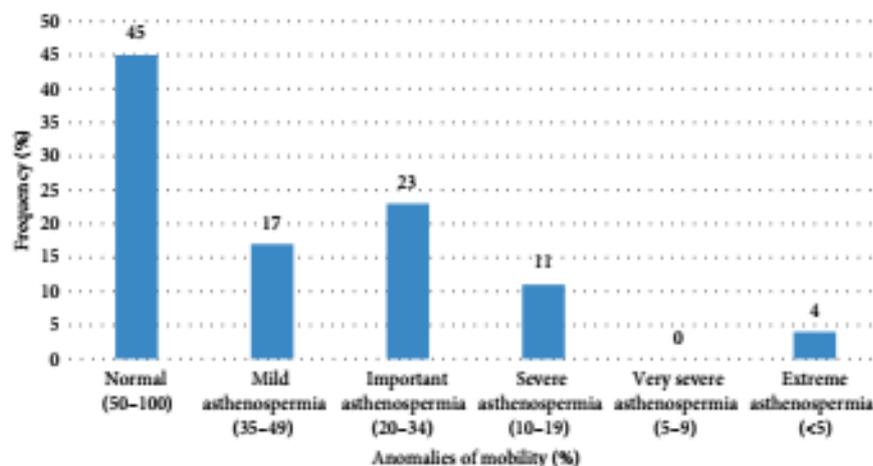


FIGURE 2: Distribution of the population according to mobility anomalies.

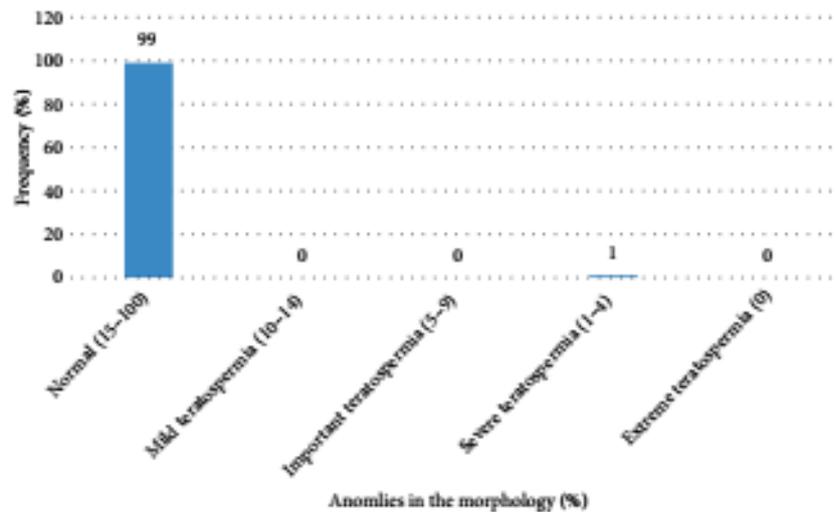


FIGURE 3: Distribution of the population based on morphology abnormalities.

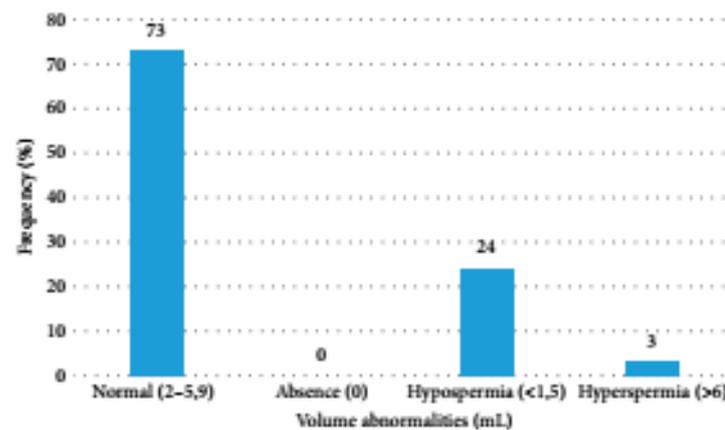


FIGURE 4: Distribution of the population according to volume anomalies.

TABLE 2: Distribution of the population according to the level of hormone FSH and Inhibin B.

Characteristics of the population	Overall population	Reference group	Case group	Normal values	<i>p</i>
Inhibin B (pg/mL)	139.1 (10.33-373.72)	153.2 (44.5-389.7)	125.94 (9.8-311.44)	>30 pg/mL	0.013
FSH (UI/L)	5.53 (0.2-29.4)	3.78 (0.1-34.93)	6.63 (0.24-28.62)	Young man: <5 UI/L Adult: 3-15 UI/L Andropause (>40 years): 37-100 UI/L	0.020

p < 0.05 was considered to be statistically significant. The significant values are *p* = 0.013 and *p* = 0.020 which is less than 0.05.

found regarding age, number of children, days of abstinence, semen volume, pH, and viscosity (*p* > 0.05).

Figure 1 presents the distribution of the population based on the anomalies in the number. It appears that in terms of frequency, patients with significant oligospermia were exco with those with very severe oligospermia (19%).

Concerning mobility abnormalities, (Figure 2) shows that 23% of patients had significant asthenospermia, 17% a mild asthenospermia and 11% a severe asthenospermia.

The abnormalities of morphologies are presented in Figure 3. We note that 99% of the patients had a normal sperm morphology.

The study of abnormalities in sperm volume (Figure 4) shows that 73% had a normal sperm volume, 24% were hypospermia, and 3% were hyperspermia.

Also, in a general point of view, about 46% of our infertile patients presented associations of the abnormalities cited above cited above (morphology, mobility, number and volume).

TABLE 3: Relationship between hormone levels and semen parameters. Correlation was done using spearman correlation test.

Semen parameters	Population	Inhibin B (r, p)	FSH (r, p)
Semen volume (mL)	Overall population	0.139 (0.096)	-0.004 (0.966)
	Reference group	0.528* ($p < 0.0001$)	-0.284 (0.051)
	Case group	0.058 (0.553)	0.065 (0.504)
Viscosity	Overall population	-0.049 (0.562)	0.024 (0.779)
	Reference group	-0.045 (0.761)	0.102 (0.488)
	Case group	-0.083 (0.393)	-0.006 (0.949)
pH	Overall population	-0.117 (0.163)	0.159 (0.057)
	Reference group	-0.283 (0.052)	0.223 (0.127)
	Case group	-0.110 (0.258)	0.152 (0.116)
Sperm concentration (million/mL)	Overall population	0.183* (0.028)	-0.217* (0.009)
	Reference group	0.043 (0.771)	-0.001 (0.992)
	Case group	0.006 (0.948)	-0.113 (0.243)
Total sperm count (million/ejaculate)	Overall population	0.307* ($p < 0.0001$)	-0.179* (0.032)
	Reference group	0.245 (0.093)	-0.045 (0.762)
	Case group	0.261* (0.006)	-0.197* (0.041)
Vitality (%)	Overall population	0.103 (0.219)	-0.197* (0.018)
	Reference group	-0.159 (0.280)	0.024 (0.869)
	Case group	-0.056 (0.565)	-0.112 (0.249)
Progressive motility (%)	Overall population	0.072 (0.388)	-0.152 (0.069)
	Reference group	0.046 (0.755)	-0.062 (0.674)
	Case group	-0.032 (0.744)	-0.036 (0.709)
Normal forms (%)	Overall population	0.088 (0.296)	0.005 (0.956)
	Reference group	0.041 (0.780)	0.064 (0.664)
	Case group	-0.084 (0.387)	-0.010 (0.922)
Leucocytes	Overall population	0.227* (0.006)	0.025 (0.764)
	Reference group	-0.103 (0.486)	-0.036 (0.805)
	Case group	0.207* (0.032)	0.006 (0.949)
Red blood cells	Overall population	-0.073 (0.386)	-0.004 (0.958)
	Reference group	/	/
	Case group	-0.030 (0.757)	0.075 (0.437)
Round cells	Overall population	-0.027 (0.747)	-0.040 (0.635)
	Reference group	-0.301* (0.038)	0.024 (0.872)
	Case group	0.070 (0.473)	0.067 (0.492)

$p < 0.05$, p_{was} considered to be statistically significant. *Significant. The significant values in this table are $p < 0.0001$, $p = 0.028$, $p = 0.006$, $p = 0.032$, $p = 0.038$, $p = 0.009$, $p = 0.018$ and $p = 0.041$.

Table 2 shows the hormonal distributions of our population. We found that FSH was significantly higher in the case group ($p = 0.020$). In contrast, the level of Inhibin B was lower in the case group ($p = 0.013$).

The analysis of the hormone concentrations according to the age classes have shown a great increase of FSH with years ($p < 0.0001$) and a decrease of Inhibin B concentration ($p = 0.328$).

3.2. Correlations between Hormone Levels and Semen Parameters. Relationship between hormone levels and semen parameters have been studied in Table 3 and we have noticed in the **overall population**, a positive correlation between Inhibin B and sperm concentration ($p = 0.028$; $r = 0.183$), total sperm count ($p < 0.0001$; $r = 0.307$) and leucocytes ($p = 0.006$; $r = 0.227$); while a negative correlation between FSH and sperm concentration ($p = 0.009$; $r = -0.217$), total sperm count ($p = 0.032$; $r = -0.179$) and vitality ($p = 0.018$; $r = -0.197$). In

the **reference group**, we noted a positive correlation between Inhibin B and the volume ($p < 0.0001$; $r = 0.528$) and a negative correlation between Inhibin B and the round cells ($p = 0.038$; $r = -0.301$). Finally, the **case group** showed positive correlation between Inhibin B and total sperm count ($p = 0.006$; $r = 0.261$) and leucocytes and a negative correlation between FSH and the total sperm count ($p = 0.041$; $r = -0.197$).

We found a strong and negative correlation between FSH and Inhibin B ($r = -0.477$; $p < 0.0001$) in the overall population, the normozoospermic group (reference group) ($r = -0.367$; $p = 0.011$), and the case group ($r = -0.511$; $p < 0.0001$).

We analyzed the relationship between semen parameters in our population. Table 4 shows that, in the overall population, positive correlation has been found between the volume and Total sperm count ($r = 0.235$) and leucocytes ($r = 0.187$); the sperm concentration and total sperm count ($r = 0.636$), vitality ($r = 0.540$), mobility ($r = 0.551$), red blood cells ($r = 0.232$), and

TABLE 4: Relationship between semen parameters in the overall population. Correlation was done using spearman correlation test.

Variables	Volume (mL)	Viscosity	pH	Sperm concentration (spz/ml)	Total sperm count (spz/ejaculate)	Vitality (1 h) %	Motility (1 h) %	Normal forms	Leucocytes	Red blood cells	Round cells
Volume (mL)	1	-0.087	-0.215*	-0.122	0.235*	0.138	0.160	0.097	0.187*	-0.065	-0.005
Viscosity	-0.087	1	0.063	-0.025	-0.033	-0.027	-0.037	-0.122	-0.192*	0.005	-0.087
pH	-0.215*	0.063	1	-0.136	-0.185*	-0.058	-0.069	0.121	-0.110	-0.043	-0.091
Sperm concentration (spz/ml)	-0.122	-0.025	-0.136	1	0.636*	0.540*	0.551*	0.076	-0.199*	0.232*	0.232*
Total sperm count (spz/ejaculate)	0.235*	-0.033	-0.185*	0.636*	1	0.525*	0.520*	0.249*	0.238*	-0.391*	-0.161
Vitality (1 h) %	0.138	-0.027	-0.058	0.540*	0.525*	1	0.969*	0.267*	0.044	-0.026	0.116
Motility (1 h) %	0.160	-0.037	-0.069	0.551*	0.520*	0.969*	1	0.269*	0.020	-0.018	0.148
Normal forms	0.097	-0.122	0.121	0.076	0.249*	0.267*	0.269*	1	0.231*	-0.194*	-0.114
Leucocytes	0.187*	-0.192*	-0.110	-0.199*	0.238*	0.044	0.020	0.231*	1	-0.525*	-0.226*
Red blood cells	-0.065	0.005	-0.043	0.232*	-0.391*	-0.026	-0.018	-0.194*	-0.525*	1	0.614*
Round cells	-0.005	-0.087	-0.091	0.232*	-0.161	0.116	0.148	-0.114	-0.226*	0.614*	1

$p < 0.05$ was considered to be statistically significant. *Significant. All the values marked with asterisk (*) are significant ($p < 0.05$).

TABLE 5: Relationship between semen parameters in the reference group. Correlation was done using spearman correlation test.

Variables	Volume (mL)	Viscosity	pH	Sperm concentration (spz/ml)	Total sperm count (spz/ejaculate)	Vitality (1 h) %	Motility (1 h) %	Normal forms	Leucocytes	Round cells
Volume (mL)	1	-0.078	-0.051	0.003	0.286*	0.006	0.142	0.037	0.071	-0.151
Viscosity	-0.078	1	0.007	-0.118	-0.095	0.082	0.087	-0.145	-0.184	0.001
pH	-0.051	0.007	1	-0.349*	-0.296*	0.115	0.002	0.200	0.038	0.124
Sperm concentration (spz/ml)	0.003	-0.118	-0.349*	1	0.793*	-0.051	0.110	-0.129	0.115	-0.010
Total sperm count (spz/ejaculate)	0.286*	-0.095	-0.296*	0.793*	1	-0.245	-0.031	-0.087	0.208	0.007
Vitality (1 h) %	0.006	0.082	0.115	-0.051	-0.245	1	0.799*	-0.211	-0.027	0.211
Motility (1 h) %	0.142	0.087	0.002	0.110	-0.031	0.799*	1	-0.072	0.104	0.267
Normal forms	0.037	-0.145	0.200	-0.129	-0.087	-0.211	-0.072	1	-0.045	-0.113
Leucocytes	0.071	-0.184	0.038	0.115	0.208	-0.027	0.104	-0.045	1	0.654*
Round cells	-0.151	0.001	0.124	-0.010	0.007	0.211	0.267	-0.113	0.654*	1

$p < 0.05$ was considered to be statistically significant. *Significant. All the values marked with asterisk (*) are significant ($p < 0.05$).

round cells ($r = 0.232$); the total sperm count and vitality ($r = 0.525$), motility ($r = 0.520$), normal forms ($r = 0.249$), and leucocytes ($r = 0.238$); the vitality and mobility ($r = 0.969$) and normal forms ($r = 0.267$); the motility and normal forms ($r = 0.269$); the normal forms and leucocytes ($r = 0.231$); the red

blood cells and round cells ($r = 0.614$). On the other hand, we observed a negative correlation between the volume and pH ($r = -0.215$); the sperm concentration and leucocytes ($r = -0.199$); the total sperm count and pH ($r = -0.185$) and red blood cells ($r = -0.391$); the normal forms and red blood cells

TABLE 6: Relationship between semen parameters in the case group. Correlation was done using spearman correlation test.

Variables	Volume (mL)	Viscosity	pH	Sperm concentration (spz/ml)	Total sperm count (spz/ejaculate)	Vitality (1 h) %	Motility (1 h) %	Normal forms	Leucocytes	Red blood cells	Round cells
Volume (mL)	1	-0.072	-0.235*	-0.109	0.193*	0.101	0.121	0.084	0.191*	-0.054	0.043
Viscosity	-0.072	1	0.061	0.059	-0.005	0.084	0.043	-0.131	-0.214*	0.013	-0.112
pH	-0.235*	0.061	1	-0.021	-0.179	-0.083	-0.072	0.194*	-0.206*	-0.051	-0.078
Sperm concentration (spz/ml)	-0.109	0.059	-0.021	1	0.597*	0.367*	0.420*	0.070	-0.258*	0.146	0.153
Total sperm count (spz/ejaculate)	0.193*	-0.005	-0.179	0.597*	1	0.347*	0.407*	0.141	0.145	-0.313*	-0.125
Vitality (1 h) %	0.101	0.084	-0.083	0.367*	0.347*	1	0.904*	0.089	-0.079	0.059	0.112
Motility (1 h) %	0.121	0.043	-0.072	0.420*	0.407*	0.904*	1	0.163	-0.111	0.045	0.142
Normal forms	0.084	-0.131	0.194*	0.070	0.141	0.089	0.163	1	0.146	-0.111	-0.109
Leucocytes	0.191*	-0.214*	-0.206*	-0.258*	0.145	-0.079	-0.111	0.146	1	-0.392*	-0.158
Red blood cells	-0.054	0.013	-0.051	0.146	-0.313*	0.059	0.045	-0.111	-0.392*	1	0.626*
Round cells	0.043	-0.112	-0.078	0.153	-0.125	0.112	0.142	-0.109	-0.158	0.626*	1

$p < 0.05$ was considered to be statistically significant. * Significant. All the values marked with asterisk (*) are significant ($p < 0.05$).

($r = -0.194$); the red blood cells and leucocytes ($r = -0.525$); the leucocytes and round cells ($r = -0.226$) and viscosity ($r = -0.192$).

As shown in Table 5, in the reference population the correlation between semen parameters showed a positive correlation between volume and total sperm count ($r = 0.286$); the total sperm count and sperm concentration ($r = 0.793$); the vitality and motility ($r = 0.799$); leucocytes and round cells ($r = 0.654$). We also noticed a negative correlation between pH and sperm concentration ($r = -0.349$) and total sperm count ($r = -0.296$).

Concerning the correlation between semen parameters in the case group (Table 6), it appears a positive correlation between volume and the total sperm count ($r = 0.193$) and the leucocytes ($r = 0.191$); the pH and normal forms ($r = 0.194$); the sperm concentration and total sperm count ($r = 0.597$), vitality ($r = 0.367$) and motility ($r = 0.420$); the total sperm count and vitality ($r = 0.347$) and motility ($r = 0.407$); the red blood cells and round cells ($r = 0.626$); vitality and motility ($r = 0.904$). We also found a negative correlation between the pH and volume ($r = -0.235$) and leucocytes ($r = -0.206$); Leucocytes and viscosity ($r = -0.214$); total sperm count and red blood cells ($r = -0.313$); sperm concentration and leucocytes ($r = -0.258$); Leucocytes and red blood cells ($r = -0.392$).

4. Discussion

Previous studies have reported that circulating levels of specific reproductive hormones in men are associated with sperm

quality parameters [4]. In particular, Inhibin B and FSH are considered markers of Sertoli spermatogenesis and cell function. It has even been suggested that measurement of both hormones in serum may be a substitute for measuring sperm quality or fecundability in epidemiological studies [4].

The current study analyzes blood levels of Inhibin B and FSH and their relationship with semen parameters.

In line with previous studies [11, 12, 22-29] we found that the infertile men's group was older than the reference group (with majority age classes from 30 to 35 followed by 40 to 45). This is probably the age at which men feel the need to start a family. More than 58% of our population had an advanced age of paternity (>35 years). In addition, we observed a great increase of FSH with years and a decrease of Inhibin concentration. The literature describes a positive and significant correlation between age and number of children, duration of infertility and marital status. This could be explained by the fact that as men age, testicular function and metabolism deteriorate when the testes undergo age-related morphological changes such as decreased germ cell counts, Leydig cells, and Sertoli, as well as structural changes, including shrinkage of seminiferous tubules [30, 31].

In men inhibin is secreted from the testis as a product of Sertoli cells involved in the regulation of FSH secretion [33]. We found a strong and negative correlation between FSH and Inhibin B in the overall population, the case and the reference group. This corroborates very well the findings of Barbotin et al. [5], Jensen et al. [32], and Von Eckardstein et al. [33], stating that FSH and Inhibin B are complementary tools in gonadal male conditions and andrological diagnostics [5]. In

particular, FSH and Inhibin B together are more sensitive than either alone in predicting the histological status of the testis and the presence of sperm in bioptic tissue [5]. FSH which is a gonadotropin that is produced and secreted by the anterior pituitary, acts on Sertoli cells in the seminiferous tubules to initiate spermatogenesis. Sertoli cells secrete Inhibin B, which is a protein hormone. Thus, as found in our study, an association between Inhibin B and sperm concentration was to be expected, since the regulation of both factors is dependent upon Sertoli cell function [4, 5, 14].

In the overall population and the case group, Inhibin B was significantly and positively correlated with sperm concentration while FSH was negatively correlated to sperm concentration. We could not observe this correlation in the normospermic group. These findings confirmed those of Jorgensen et al. in 2010 [15], Kumanov et al. in 2006 [16], Myers et al. in 2008 [17], Sikaris et al. in 2005 [18] and Grunewald et al. in 2013 [19]. Moreover, Barbotin et al. explained that associations between hormone levels and sperm count are stronger in studies of the general population [32, 34] or infertile men [4, 16, 17, 35] than in studies of fertile men [15, 17]. They were precise that it could be due to the marked interindividual differences in sperm count seen in populations of primarily normozoospermic and/or fertile men. In total, categories of men (fertile, infertile, and normozoospermic) represented overlap in semen qualities, suggesting that Inhibin B and FSH were not mainly markers of fertility but rather markers of semen quality and thereby fecundity. In addition, it has been suggested that Inhibin B may be a better predictor of spermatogenesis than FSH [33]. The clinical value of the Inhibin B assay is emphasized by the fact that in contrast to FSH, Inhibin B is produced inside the testis and might reflect close interactions between Sertoli and germ cells [33]. Thus, Inhibin B levels correlate directly with spermatogenesis and reflect testicular sperm production.

Although the known association between sperm motility and sperm concentration [17], we could not observe in our population a correlation between sperm motility and Inhibin B and FSH levels but we did observe the correlation between sperm concentration and vitality and mobility both in the overall population and the case group but not in the normospermic group. Considering their overall population, Tomlinson et al. [20] and Karabulut et al. [21] also found a strong correlation between the sperm concentration, the motility and the morphology. Our results are different from Barbotin et al. who observed in their population a relationship between sperm motility and Inhibin B and FSH levels. But just like us they found a strong relationship between sperm concentration and vitality and mobility both in the overall population and the case group but not in the normospermic group. This could be explained by the fact that they included a very large number of individuals compared to our sample size.

5. Conclusion

At the end of this study, our results showed lower values of semen parameters in the case group especially concerning the sperm concentration, the progressive motility, the vitality, and the percentage of normal forms.

The correlation of Inhibin B and FSH to the sperm parameters highlights their role as markers of spermatogenesis. The combination of FSH and Inhibin B is currently the best predictor of the presence of spermatozoa.

Data Availability

The biological data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

There is no conflict of interest regarding any of the authors.

Authors' Contributions

Study concept and design: Ngogang Yonkeu Jeanne, Pieme Constant Anatole, and Tchoula Mamiafo Corinne. Data collection: Tchoula Mamiafo Corinne. Statistical analysis: Tchoula Mamiafo Corinne. Drafting: Tchoula Mamiafo Corinne. Manuscript revision: Ngogang Yonkeu Jeanne, Pieme Constant Anatole and Tchoula Mamiafo Corinne. Study supervision: Ngogang Yonkeu Jeanne.

Acknowledgments

This research did not receive any specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sector.

References

- [1] T. G. Cooper, E. Noonan, S. von Eckardstein et al., "World Health Organization reference values for human semen characteristics," *Human Reproduction*, vol. 16, pp. 231-245, 2010.
- [2] L. Speroff and M. A. Fritz, "Female infertility, Chapter 27," *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Lippincott Williams & Wilkins, 8th edition, 2010, sy# 1157.
- [3] G. Sartorius and E. Nieschlag, "Paternal age and reproduction," *Human Reproduction*, vol. 16, pp. 65-79, 2010.
- [4] J. D. Meeker, L. Godfrey-Bailey, and R. Hauser, "Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic," *Journal of Andrology*, vol. 28, no. 3, pp. 397-406, 2007.
- [5] A.-L. Barbotin, C. Ballot, J. Sigala et al., "The serum Inhibin B concentration and reference ranges in normozoospermia," *European Journal of Endocrinology*, vol. 172, pp. 669-676, 2015.
- [6] B. D. Anawalt, "Approach to male infertility and induction of spermatogenesis," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 98, no. 9, pp. 3532-3542, 2013.
- [7] Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, "Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion," *Fertility and Sterility*, vol. 98, no. 2, pp. 294-301, 2012.
- [8] V. Mitchell, G. Robin, F. Boitrelle et al., "Correlation between testicular sperm extraction outcomes and clinical, endocrine and testicular histology parameters in 120 azoospermic men with normal serum FSH levels," *International Journal of Andrology*, vol. 34, pp. 299-305, 2011.

- [9] World Health Organization (WHO), *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*, University Press, Cambridge, 4th edition, 1999.
- [10] H. Ludlow, S. Muttukrishna, M. Hyvönen, and N. P. Groome, "Development of a new antibody to the human inhibin/activin betaB subunit and its application to improvement Inhibin B ELISAs," *Journal of Immunological Methods*, vol. 329, no. 1-2, pp. 102-111, 2008.
- [11] V. Subramanian, A. Ravichandran, N. Thiagarajan, M. Govindarajan, S. Dhandayuthapani, and S. Suresh, "Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility," *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, vol. 45, no. 2, pp. 88-93, 2018, pISSN 2233-8233, eISSN 2233-8241.
- [12] Q. A. Makarim, S. A. Rana, and F. Muhammad-Baqir, "Relationship between lipid peroxidation and integrity of sperm plasma membrane in a sample of Iraqi infertile men IOSR," *Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, vol. 12, no. 6 Ver. I, pp. 19-27, 2017.
- [13] C. D. Okafor, S. C. Meludu, K. Nwaefulu, J. I. Ikechebelu, C. E. Dioka, and U. Obi, "Comparison of serum oxidative stress markers among male partners of fertile and infertile couple at Nnamdi Azikiwe University Teaching Hospital, Nnewi, Anambra State," *Nigeria Journal of Scientific and Innovative Research*, vol. 6, no. 4, pp. 126-128, 2017.
- [14] F. H. Pierik, J. T. M. Vreeburg, T. Stijnen, F. H. De Jong, and R. F. A. Weber, "Serum Inhibin B as a marker of spermatogenesis," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2006, jcem.endojournals.org at Medical Library Erasmus MC on December 11, 0021-972X/98/503.00/0.
- [15] N. Jorgensen, F. Liu, A. M. Andersson et al., "Serum inhibin-b in fertile men is strongly correlated with low but not high sperm counts: a coordinated study of 1,797 European and US men," *Fertility and Sterility*, vol. 94, no. 6, pp. 2128-2134, 2010.
- [16] P. Kumanov, K. Nandipati, A. Tomova, and A. Agarwal, "Inhibin B is a better marker of spermatogenesis than other hormones in the evaluation of male factor infertility," *Fertility and Sterility*, vol. 86, no. 2, pp. 332-338, 2006.
- [17] G. M. Myers, G. M. Lambert-Messerlian, and M. Sigman, "Inhibin B reference data for fertile and infertile men in Northeast America," *Fertility and Sterility*, vol. 92, pp. 1920-1923, 2009.
- [18] K. Sikaris, R. I. McLachlan, R. Kazlauskas, D. de Kretser, C. A. Holden, and D. J. Handelsman, "Reproductive hormone reference intervals for healthy fertile young men: evaluation of automated platform assays," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 90, pp. 5928-5936, 2005.
- [19] S. Grunewald, H.-J. Glander, U. Paasch, and J. Kratzsch, "Age-dependent Inhibin B concentration in relation to FSH and semen sample qualities: a study in 2448 men," *Reproduction*, vol. 14, no. 5, pp. 237-244, 2013.
- [20] M. J. Tomlinson, O. Moffatt, G. C. Manicardi, and D. Sakkas, "Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA before and after density gradient centrifugation: implication for assisted conception. European society of human Reproduction and Embryology," *Human Reproduction*, vol. 16, no. 10, pp. 2160-2165, 2001.
- [21] S. Karabulut, I. Keskin, and Y. Sagiroglu, "Relationship between semen parameters in samples obtained from sub-fertile," *Andrology (Los Angel)*, vol. 6, no. 1, 2017.
- [22] F. Atig, A. Kerkeni, A. Saad, and M. Ajina, "Effects of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men," *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 34, no. 3, pp. 373-381, 2017.
- [23] A. Mehrotra, D. K. Katiyar, A. Agarwal, V. Das, and K. K. Pant, "Role of total antioxidant capacity and lipid peroxidation in fertile and infertile men," *Biomedical Research-India*, vol. 24, pp. 347-352, 2013.
- [24] M. A. El-Taieb, M. A. Ali, and E. A. Nada, "Oxidative stress and acrosomal morphology: a cause of infertility in patients with normal semen parameters," *Middle East Fertility Society Journal*, vol. 20, no. 2, pp. 79-85, 2015.
- [25] T. Kullisaar, S. Turk, K. Kilk, K. Ausmees, M. Punab, and R. Mandar, "Increased levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in male partners of infertile couples," *Andrology*, vol. 1, no. 6, pp. 850-858, 2013.
- [26] S. Benedetti, M. C. Tagliamonte, S. Catalani et al., "Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality," *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 25, no. 3, pp. 300-306, 2012.
- [27] Y. Gao, Y. Gao, L. Du, Z. Qin, and Z. Hu, "Zinc, lead, cadmium, malondialdehyde contents and superoxide dismutase activity in serum and seminal plasma in male infertility patients," *Journal of Reproductive Medicine*, vol. 21, pp. 43-46, 2012, Article in Chinese.
- [28] M. B. Shamsi, R. Kumar, N. Malhotra et al., "Chromosomal aberrations, Yq microdeletion, and sperm DNA fragmentation in infertile men opting for assisted reproduction," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 79, no. 9, pp. 637-650, 2012.
- [29] O. Alejandro, A. Spira, and L. Multigner, "Contribution of environmental factors to the risk of male infertility," *Human Reproduction*, vol. 16, no. 8, pp. 1768-1776, 2001.
- [30] S. Gunes, G. N. Hekim, M. A. Arslan, and R. Asci, "Effects of aging on the male reproductive system," *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 33, no. 4, pp. 441-454, 2016.
- [31] D. Durairajanayagam, "Lifestyle causes of male infertility," *Arab Journal of Urology*, vol. 16, no. 1, pp. 10-20, 2018.
- [32] T. K. Jensen, A. M. Andersson, N. H. Hjollund et al., "Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A study of 349 Danish men," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 82, no. 12, pp. 4059-4063, 1997.
- [33] S. Von Eckardstein, M. Simoni, M. Bergmann et al., "Serum Inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 84, pp. 2496-2501, 1999.
- [34] M. L. Uhler, M. J. Zinaman, C. C. Brown, and E. D. Clegg, "Relationship between sperm characteristics and hormonal parameters in normal couples," *Fertility and Sterility*, vol. 79, pp. 1535-1542, 2003.
- [35] F. H. Pierik, A. Burdorf, F. H. de Jong, and R. F. Weber, "Inhibin B: a novel marker of spermatogenesis," *Annals of Medicine*, pp. 3512-3520, 2003.