

Analyse du statut oxydatif spermatique chez des patients infertiles

Analysis of sperm oxidative status in infertile patients

H Ben Ali · F Atig · S Mehri · A Saad · M Ajina

Reçu le 20 mars 2012 ; accepté le 14 août 2012
© SALF et Springer-Verlag France 2012

Résumé Introduction : L'infertilité masculine constitue un problème de santé publique. Plusieurs facteurs sont à l'origine de ce phénomène. Actuellement, le stress oxydatif est incriminé comme l'une des principales causes. Dans notre étude, nous avons cherché une corrélation entre les marqueurs du stress oxydatif et les caractéristiques spermatiques (numération, mobilité, morphologie).

Matériel et méthodes : Nous avons évalué le statut oxydatif spermatique de 129 sujets infertiles. Ces sujets sont caractérisés par une infertilité de durée variable. Ils ont été subdivisés en quatre groupes : des sujets normozoospermiques considérés comme témoins ($n=34$) ; des asthénozoospermiques (Asthéno, $n=43$) ; des oligozoospermiques (Oligo, $n=22$) et tératozoospermiques (Térato, $n=30$). Parmi les marqueurs du stress oxydatif, nous avons évalué, dans le plasma séminal, le zinc, le calcium, le magnésium et le sélénium par spectrométrie d'absorption atomique à flamme et à four. Le malondialdéhyde (MDA) est dosé par spectrofluorométrie.

Résultats : Les résultats de notre étude montrent que les concentrations séminales du zinc et du sélénium sont plus élevées chez les normozoospermiques que les concentrations de ces mêmes éléments chez les autres groupes. La concentration séminale en zinc est significativement corrélée avec la numération spermatique ($r=0,49$; $p<0,001$) et le MDA ($r=-0,35$; $p<0,05$). La mobilité des spermatozoïdes est corrélée avec le calcium ($r=0,41$; $p<0,001$) et le magnésium ($r=0,31$; $p<0,05$). La concentration du MDA est plus élevée chez les trois groupes de patients : oligospermiques ($3,22\pm 1,37$ $\mu\text{g/ml}$), asthénospermiques ($3,52\pm 1,93$ $\mu\text{g/ml}$) et tératospermiques ($3,64\pm 1,73$ $\mu\text{g/ml}$) par rapport aux témoins ($2,32\pm 0,94$ $\mu\text{g/ml}$).

Une seule corrélation positive a été observée entre le MDA et la morphologie ($r=0,19$; $p<0,05$).

Conclusion : Notre étude confirme que le stress oxydatif joue un rôle important dans le processus des altérations des spermatozoïdes. Les radicaux libres peuvent, en effet, modifier la structure membranaire ainsi que celle de l'acide désoxyribonucléique. Ces altérations conduisent aussi à une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes de formes anormales.

Mots clés Infertilité · Stress oxydatif · Éléments trace

Abstract Introduction: Male infertility constitutes public health problems. Several factors are at the origin of this phenomenon. Currently, the oxidative stress is accused to be one of the leading causes. In our study, we sought a correlation between the markers of the oxidative stress and the sperm characteristics (morphology).

Material and methods: We evaluated the antioxidant status in the seminal plasma of 129 infertile men. Patients were characterized by infertility of variable duration. They were divided into four groups: normozoospermics who were considered as controls ($n=34$), asthenozoospermics (Asthenozoospermics; $n=43$), oligozoospermics (Oligo; $n=22$) and teratozoospermics (Terato; $n=30$). Among the oxidative stress markers, we evaluated, in seminal plasma, zinc, calcium, magnesium and selenium by spectrophotometry of atomic absorption to flame and furnace. The malondialdehyde (MDA) is proportioned by spectrofluorometry.

Results: Our results show that the seminal concentrations of zinc and selenium are higher in the control group than the concentrations of these same elements in the three other groups. The seminal zinc concentration was significantly correlated with the sperm count ($r=0.49$; $p < 0.001$) and MDA ($r=-0.35$; $p<0.05$). Sperm motility was correlated with calcium ($r=0.41$; $p<0.001$) and magnesium ($r=0.31$; $p<0.05$). The MDA concentration is higher in the three groups of patients: oligozoospermics (3.22 ± 1.37 $\mu\text{g/ml}$), asthenozoospermics (3.52 ± 1.93 $\mu\text{g/ml}$) and teratozoospermics (3.64 ± 1.73 $\mu\text{g/ml}$) compared with controls (2.32 ± 0.94 $\mu\text{g/ml}$). A single positive

H Ben Ali (✉) · A Saad · M Ajina
Laboratoire de cytogénétique, génétique moléculaire
et biologie de la reproduction humaines,
CHU Farhat Hached Sousse, Tunisie
e-mail : alihabibsaoudite@yahoo.fr

F Atig · S Mehri · A Saad · M Ajina
Unité de médecine de la reproduction,
CHU Farhat Hached de Sousse, Tunisie

correlation was observed between the MDA and morphology ($r=0.19$; $p<0.05$).

Conclusion: Our study confirms that the oxidative stress plays an important role in the process of deteriorations of the spermatozoa. The free radicals can, indeed, modify the membrane structure as well as the membrane structure of the deoxyribonucleic acid. These deteriorations also lead to an increase in the percentage of sperm of abnormal forms.

Keywords Infertility · Oxidative stress · Trace elements

Introduction

La fertilité d'origine masculine constitue, de plus en plus, le sujet des recherches durant ces dernières décennies. 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 [1]. 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 » (ROS). 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...) [2-4] 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 [5]. Les spermatozoïdes, soumis à un stress oxydatif, présentent des altérations structurales de l'ADN. Les radicaux libres peuvent aussi induire une peroxydation des lipides membranaires des spermatozoïdes. L'acide malondialdéhyde (MDA) est un marqueur de la peroxydation des lipides. Il est utilisé dans des analyses biochimiques pour surveiller le degré d'altérations peroxydatives des spermatozoïdes [6]. Ce marqueur est d'ailleurs corrélé au degré d'altération de la fonction spermatique. Les niveaux élevés de MDA séminal représentent des taux accrus de peroxydation des lipides qui diminuent la fertilité [6,7].

L'objectif de cette étude est de rechercher une relation entre certains marqueurs du stress oxydatif (zinc, sélénium, magnésium, calcium, MDA) et les paramètres du spermogramme (numération, mobilité, morphologie).

Matériel et méthodes

Patients

Conception de l'étude et choix des sujets

L'étude a été réalisée sur 129 hommes consultant pour infertilité dans notre laboratoire de cytogénétique et biologie de la reproduction, à l'hôpital Farhat Hached de Sousse, en Tunisie. Les critères d'inclusion et d'exclusion pour le choix des sujets infertiles se présentaient comme suit :

- critères d'inclusion : des hommes infertiles menant une vie conjugale pendant au moins un an sans aucune contraception ;
- critères d'exclusion : les antécédents médicaux ont été examinés pour tous les cas. Les sujets sous une quelconque médication ou une supplémentation antioxydante ne font pas partie de l'étude. En outre, les sujets porteurs de varicocèle, d'une infection génitale, d'une leucospermie ou d'une quelconque maladie ne font pas partie de l'étude. Les hommes fumeurs ou alcooliques ont été exclus de l'étude en raison de leurs niveaux séminaux élevés de ROS qui diminuent l'activité antioxydante des spermatozoïdes.

Analyse de sperme

Les échantillons de sperme ont été recueillis par masturbation dans des flacons stériles après trois jours d'abstinence sexuelle. Après trente minutes de liquéfaction, les paramètres spermatiques (volume, mobilité, concentration et morphologie) ont été immédiatement évalués selon les normes de l'OMS (1999) [8]. La mobilité des spermatozoïdes a été classifiée dans quatre catégories : mobilité rapide et progressive (type a), mobilité progressive lente (type b), les spermatozoïdes mobiles et incapables de mouvement non progressif (type c), les spermatozoïdes immobiles (type d). La mobilité progressive totale est la somme des deux catégories (a+b) (une mobilité est considérée comme normale si la somme [a+b] est supérieure à 50 % [ou la mobilité type « a » >25 %] entre 0,5 et 2 heures après liquéfaction).

La numération spermatique a été déterminée grâce à l'hématimètre de Neubauer (Neubauer Hemacytometer[®] counting chamber) et la valeur normale était supérieure à 20 millions de spermatozoïdes/ml. La morphologie des spermatozoïdes est évaluée grâce à la classification de « David » [9] et elle est normale à partir de 30 %.

Après l'étude du sperme, quatre groupes de patients ont été définis (le détail des groupes et des caractéristiques spermatiques sont indiqués dans le Tableau 1) :

Tableau 1 Caractéristiques générales de la population étudiée			
Paramètres	Caractéristiques	Nombre	Pourcentage (%)
Âge (ans)	≤35	54	42
	>35	75	58
Durée de l'infertilité (ans)	≤10	93	72,1
	>10	36	27,9
Type d'infertilité	Primaire	95	73,6
	Secondaire	34	26,4
Région	Rurale	48	37,6
	Urbaine	81	62,4
Critères spermatiques	Témoins*	34	26,4
	Oligozoospermiques ¹	22	17,1
	Asthénozoospermiques ²	43	33,3
	Tératozoospermiques ³	30	23,2

*Témoins : [numération > 20x10⁶ spz/ml ; mobilité (a)>25 % ; morphologie > 30 %].
¹Oligozoospermiques : [numération < 20x10⁶ spz/ml ; mobilité (a)> 25 % ; morphologie > 30 %].
²Asthénozoospermiques : [numération > 20x10⁶ spz/ml ; mobilité (a) < 25 % ; morphologie > 30 %].
³Tératozoospermiques : [numération > 20x10⁶ spz/ml ; mobilité (a) >25 % ; morphologie < 30 %].

- des sujets normozoospermiques (n=34) : les patients de ce groupe sont des hommes (témoins) présentant des critères spermatiques normaux. Ils sont caractérisés par une mobilité normale ([a]>25 %), une numération (> 20x10⁶ spermatozoïdes/ml) et une morphologie normale des spermatozoïdes >30 % ;
- des sujets asthénozoospermiques (n=43) : ces patients ont des caractéristiques spermatiques normales sauf une anomalie de la mobilité type [a] des spermatozoïdes (<25 %) ;
- des sujets oligozoospermiques (n=22) : l'infertilité de ces patients est seulement définie par une oligozoospermie isolée (<20x10⁶ spermatozoïdes/ml), les autres paramètres spermatiques sont normaux ;
- des sujets tératozoospermiques (n=30) : tous les patients de cette catégorie ont présenté une morphologie des spermatozoïdes inférieure à 30 %. Les autres paramètres spermatiques sont normaux.

Pour la suite de l'étude, les sujets normospermiques constituent le groupe témoin ; et l'ensemble des sujets (asthénozoospermiques, oligozoospermiques et tératozoospermiques) sont appelés les patients.

Après cette analyse spermatique, le sperme est centrifugé à grande vitesse pendant 15 minutes et le plasma séminal est congelé à -80°C pour le dosage des éléments trace, des éléments minéraux et du MDA.

Méthode de dosage des éléments trace (zinc et sélénium)

Pour toute l'expérience, la spectrophotométrie d'absorption atomique de flamme a été adoptée pour la détermination du

zinc et la spectrophotométrie à four pour la mesure du sélénium [10]. Les mesures ont été mises en application utilisant un Zeenit 700-Analytik-Jena, Allemagne (flamme et Graphite-Four), équipé de la correction de deutérium et de fond de Zeeman, respectivement, comme recommandé par le fabricant. Les limites de détection pour le zinc et le sélénium étaient respectivement de 0,47 µg/l et 0,78 µg/l.

Méthode de dosage des éléments minéraux (calcium, magnésium)

Ces deux minéraux sont quantifiés dans le plasma séminal grâce à la spectrophotométrie à flamme [10]. Du lanthane à 0,1 % a servi pour préparer les gammes étalons à partir des solutions commerciales de calcium (1 g/l) et de magnésium (1 g/l).

Méthode de dosage du malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation de lipide a été mesurée en déterminant la production de MDA, utilisant la méthode de l'acide thiobarbiturique (ATB) [11]. 0,1 ml de plasma séminal a été ajouté à 0,75 ml de réactif d'ATB : 0,8 g de 2-TBA s'est dissous dans 80 ml d'eau distillée avec 0,5 ml de NaOH ; l'acide perchlorique (7 %) a été ajouté à ce mélange afin d'ajuster le pH=7,4. Ce mélange était chauffé pendant une heure à 95°C dans un bain d'eau chaude. Après refroidissement, le tube a été centrifugé pendant dix minutes à 4000 tours/mn et la densité optique du surnageant a été lue sur un spectrophotomètre à 535 nanomètres.

Étude statistique

La comparaison des moyennes entre les groupes, l'étude des corrélations (test de Pearson) entre les paramètres du spermogramme (numération, mobilité et morphologie) et les éléments dosés, ainsi que l'analyse des corrélations, sont effectués à l'aide du logiciel « *statistical package for social sciences* » (SPSS, Chicago, IL, États-Unis). La comparaison des moyennes est faite par le test de Student. Les valeurs sont considérées statistiquement significatives quand $p < 0,05$ ($p < 0,05$ =significatif ; $p < 0,001$ =hautement significatif).

Résultats

D'après les données du Tableau 2, l'âge moyen du groupe témoin ($33,43 \pm 4,4$ ans) est inférieur à l'âge moyen du groupe asthénozoospermique ($34,95 \pm 4,2$ ans), du groupe oligozoospermique ($40,27 \pm 4,5$ ans) et du groupe tératozoospermique ($39 \pm 5,01$ ans), mais la différence n'était pas significative. Il n'y avait aucune corrélation significative entre l'âge du patient et le statut antioxydant séminal. Les valeurs moyennes des paramètres examinés de sperme des témoins et des autres groupes sont indiquées dans le Tableau 2. La mobilité et la morphologie normale étaient sensiblement plus élevées chez les témoins que chez les patients.

La comparaison des concentrations moyennes en éléments trace, éléments minéraux et en malondialdéhyde entre les patients ($n=95$) et les témoins ($n=34$) selon les paramètres du spermogramme, nécessite d'étudier chacun des paramètres du spermogramme (numération, mobilité, morphologie) à part. En effet, pour chaque paramètre du spermogramme, nous avons classé notre échantillon en deux groupes (patients et témoins). Le groupe témoin renferme 34 sujets dont les trois caractéristiques spermatisques étudiées sont normales. L'autre groupe renferme les patients dont le paramètre étudié est anormal, l'effectif de ce groupe est variable d'un paramètre à l'autre. Puis nous avons vérifié

s'il existe une relation entre les concentrations séminales de chaque élément et les paramètres spermatisques déjà cités. Enfin, une étude des corrélations est effectuée en tenant compte des effets croisés entre les différents paramètres.

Groupe témoin (n=34) et sujets oligozoospermiques (n=22)

Le groupe témoin a une concentration séminale en zinc de 144,01 mg/l, alors que cette concentration est plus basse chez les oligozoospermiques (120,51 mg/l). La différence entre les concentrations moyennes des deux groupes n'est pas significative (Tableau 3), mais nous avons trouvé une corrélation positive faible entre la concentration séminale en zinc et la numération spermatique ($r=0,49$; $p \leq 0,001$) (Tableau 4). Concernant le sélénium, la concentration moyenne est plus élevée chez le groupe témoin (64 $\mu\text{g/l}$) par rapport au groupe des oligozoospermiques (55 $\mu\text{g/l}$). Une corrélation faiblement positive mais non significative entre la concentration séminale en sélénium et la numération spermatique ($r=0,12$; $p=0,08$). Le groupe des oligozoospermiques a une concentration moyenne en calcium (290,13 mg/l) plus élevée que le groupe témoin (178 mg/l), alors que la concentration moyenne en magnésium est plus élevée chez le groupe témoin (101,21 mg/l) que le groupe des patients (70,53 mg/l). La différence entre les concentrations moyennes des deux groupes est significative pour le calcium ($p \leq 0,001$) ainsi que pour le magnésium ($p \leq 0,005$). Par ailleurs, nous avons noté une corrélation négative non significative entre la concentration du calcium et la numération spermatique ($r=-0,37$; $p=0,26$), elle est également positive non significative pour le magnésium ($r=0,31$; $p=0,17$). La concentration moyenne en malondialdéhyde est plus élevée chez le groupe des oligozoospermiques que celui des témoins (3,22 vs 2,32 $\mu\text{g/l}$), la différence étant significative ($p \leq 0,004$). Une corrélation négative significative est établie entre la concentration séminale en MDA et la numération spermatique ($r=-0,35$; $p < 0,05$).

Tableau 2 Description statistique et comparaison des paramètres spermatisques conventionnels entre le groupe témoin et les trois groupes de patients

Paramètres	Témoin (n=34)	Astheno (n=43)	Oligo (n=22)	Terato (n=30)
Âge (ans)	33,43±4,40	34,95±4,20	40,27±4,50	39,00±5,01
Abstinence sexuelle (jours)	3,01±0,75	4,10±0,27	3,75±0,91	3,85±1,02
Volume (ml)	3,89±1,48	3,34±1,67	4,21±2,44	3,65±1,73
Mobilité (a) (%)	48,72±14,22	18,40±9,62	45,72±13,42	44,32±12,45
Numération ($\times 10^6$ spz/ml)	75,86±23,83	46,21±24,01	9,56±6,51	54,00±26,23
Tératozoospermie (%)	60,90±13,28	60,42±11,85	65,24±16,36	81,79±11,49

Astheno = sujets asthénozoospermiques ; Oligo = sujets oligozoospermiques ; terato = sujets tératozoospermiques ; ml = millilitre de sperme ; moyennes exprimées \pm déviation standard.

Tableau 3 Comparaison des concentrations moyennes en éléments trace, éléments minéraux et le malondialdéhyde entre les témoins (n=34) et les patients oligozoospermiques (n=22), asthénospermiques (n= 43) et tératospermiques (n= 30)

Paramètres	Témoins	oligozoospermiques	asthénospermiques	tératospermiques
Zinc (mg/ml)	144,01±42,13	120,51±25,33	122,02±34,69	126,02±24,82
Sélénium (µg/ml)	64,00±20,6	55,00±21,44	56,11±22,81	57,01±24,31
Calcium (mg/ml)	178,00±19,8	290,13±28,09	262,21±23,18	250,08±21,04
Magnésium (mg/ml)	101,21±15,81	70,53±8,11	82,09±3,06	85,03±9,78
Malondialdéhyde (µg/ml)	2,32±0,94	3,22±1,37	3,52±1,93	3,64±1,73

Tableau 4 La valeur des coefficients de corrélation de Pearson calculés entre les paramètres oxydatifs et des critères de qualité du sperme

	Numération (n=129)	Mobilité (n=129)	Morphologie (n=129)
Zinc	0,49**	0,29	NS
Sélénium	0,12	0,36	NS
Calcium	-0,37	0,41**	NS
Magnésium	0,31	0,31*	NS
MDA	-0,35*	-0,24**	0,19*

* : corrélation significative (p<0,05) ; ** : corrélation hautement significative (p<0,001) ; NS : non significatif.

Groupe témoin (n=34) et sujets asthénozoospermiques (n=43)

En se basant sur la mobilité des spermatozoïdes, nous avons comparé les deux groupes. Le groupe témoin renferme les 34 sujets ayant un spermogramme normal. Le groupe des asthénozoospermiques comporte 43 sujets qui présentent une asthénospermie (mobilité type [a] <25 %) [8].

Les témoins ont des concentrations moyennes de zinc et de sélénium plus importantes que celles des asthénozoospermiques. En effet, chez les témoins, la moyenne en zinc est de 144,01 mg/l et de 64 µg/l pour le sélénium (Tableau 3), alors que le groupe des asthénozoospermiques a une concentration moyenne en zinc et en sélénium respectivement de 122,02 mg/l et de 56,11 µg/l. La différence de concentrations moyennes entre les deux groupes n'est pas significative pour les deux éléments traces. Les corrélations, faibles, entre les concentrations séminales en zinc et en sélénium et la mobilité ne sont pas significatives (zinc/mobilité : r=0,29 ; p=0,07 ; sélénium/mobilité : r=0,36 ; p=0,09).

Nos résultats ont conclu à une augmentation de la concentration séminale en calcium (262,21 mg/l) et une baisse en magnésium (82,09 mg/l) chez le groupe des asthénozoospermiques, alors que les concentrations chez les témoins sont de 178 mg/l pour le calcium et de 101,21 mg/l pour le magnésium. Les différences sont significatives (Ca : p<0,001,

Mg : p<0,008) et les corrélations faibles (calcium/mobilité [r=0,41 ; p<0,001] et magnésium/mobilité [r=0,31 ; p<0,05]) mais significatives.

La concentration moyenne séminale en malondialdéhyde est significativement plus élevée chez le groupe des asthénozoospermiques que chez celui des témoins (3,52 µg/l vs 2,32 µg/l) (Tableau 3). Nous avons constaté, par ailleurs, que plus la concentration du malondialdéhyde augmente, plus la mobilité diminue. Ceci est confirmé par une corrélation significative (r=-0,24 ; p<0,01).

Groupe témoin (n=34) et sujets tératozoospermiques (n=30)

Nous avons considéré le même groupe témoin (n=34) alors que le groupe tératozoospermique présentant un pourcentage des formes normales des spermatozoïdes inférieur à 30 % (classification de David) [9].

Nous constatons une élévation des concentrations moyennes en zinc et en sélénium chez le groupe témoin par rapport au groupe tératospermique. La concentration moyenne en zinc est de 144,01 mg/l pour les témoins et de 126,02 mg/l pour le groupe tératospermique, alors que les concentrations du sélénium sont respectivement de 64 µg/l et de 57,01 µg/l pour les témoins et le groupe tératospermique. Aussi bien pour le zinc que pour le sélénium, la différence de concentrations moyennes entre les deux groupes n'est pas significative. Selon nos résultats, la concentration moyenne du calcium séminal est plus élevée chez le groupe tératospermique que chez le groupe témoin. Alors que la concentration moyenne du magnésium est plus élevée chez ce dernier. Mais comme pour le calcium, la différence de concentrations moyennes du magnésium entre les deux groupes n'est pas significative. En effet, chez le groupe témoin, les concentrations séminales du calcium et du magnésium sont respectivement de 178 mg/l et de 101,21 mg/l, alors que chez le groupe tératospermique, elles sont de 250,08 mg/l et 85,03 mg/l. Néanmoins, une corrélation non significative est notée entre les concentrations du calcium et les pourcentages des formes anormales ; il en est de même pour le magnésium. Nous avons noté également une différence significative de concentrations moyennes en MDA entre

les deux groupes (témoin et tératozoospermique). Plus la concentration séminale en MDA augmente, plus le pourcentage des formes anormales augmente ; cette corrélation est faiblement positive mais significative ($r=0,19$; $p<0,05$).

Discussion

Le profil en éléments trace, en éléments minéraux et en autres marqueurs du stress oxydatif, tels que le malondialdéhyde (MDA), a fait l'objet de très peu d'études sur le sperme. De plus, ce profil au niveau du plasma séminal varie d'une étude à l'autre. Concernant les éléments trace, nos résultats ont montré que chez les témoins, la concentration moyenne en zinc concorde avec des valeurs trouvées dans la littérature [10,12]. Ils sont par contre inférieurs à ceux d'une autre équipe [13]. Ces auteurs ont utilisé la spectroscopie d'absorption atomique électrothermique. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de ces valeurs par rapport à celles de nos sujets, déterminées par la spectroscopie d'absorption atomique à flamme.

L'action du zinc sur les caractéristiques du sperme est certaine puisqu'il a été démontré que le zinc a un effet stimulateur aussi bien sur le développement des gonades [14] que sur la spermatogenèse [15]. Il a été noté qu'en plus de son effet stimulateur sur la production des spermatozoïdes, le zinc protège ces derniers contre leur dégradation [16]. Ces travaux pourraient suggérer l'importance du zinc dans le sperme. Nos résultats corroborent cette hypothèse puisque nous avons trouvé que la concentration moyenne du zinc dans le plasma séminal est plus élevée chez les témoins que chez les patients. Ces résultats sont en désaccord avec ceux d'autres auteurs [10,17]. Cette différence peut être expliquée aussi bien par une différence globale des caractéristiques spermatiques que par une différence sur les critères d'inclusion. Nos critères étaient les données du spermogramme alors que ceux de Sorensen et al. [10] étaient la durée de la conception. Ils ont ainsi divisé leurs patients en deux groupes : le premier, considéré comme témoin, est celui qui a conçu après un mois de mariage (courte durée pour la conception). Le second groupe, celui des patients, comprend les sujets qui ont conçu après dix mois (longue durée pour la conception). Ce problème d'échantillonnage peut être évité en cherchant une éventuelle corrélation entre le statut en zinc et les paramètres du sperme (la numération, la mobilité et la morphologie). Nous avons montré qu'il existe une corrélation positive faible entre le statut en zinc et les trois paramètres du sperme suscités en accord avec d'autres travaux [18,19]. D'ailleurs, l'oligoasthénospermie est toujours associée à une faible teneur en zinc séminal [20]. Certes, l'effet du zinc sur la numération est très probable, puisqu'il stimule le développement des gonades et des tubes séminifères ainsi que la spermatogenèse. Cet oligo-

élément est même indispensable pour le maintien des fonctions physiologiques des spermatozoïdes. Une étude du zinc de la tête du spermatozoïde a montré une concentration de 2,6 ng millions de spermatozoïdes, alors qu'au niveau du flagelle, elle est de 37,3 ng millions de spermatozoïdes [12]. En effet, le zinc se fixe au niveau du plasma séminal à des vésicules appelées prostasomes [17,21]. Ces prostasomes sont de petites vésicules, contenant le zinc, sécrété par la prostate dans le plasma séminal humain et montrant un rôle physiologique sur des propriétés du sperme. D'autres études ont confirmé que le zinc se fixe essentiellement au niveau des fibres denses externes. Ces dernières sont responsables de la mobilité et de la résistance du flagelle contre les forces de traction.

En ce qui concerne le sélénium, son taux est élevé chez les témoins par rapport aux patients sans que cette différence soit significative. Aussi bien notre étude que celle d'autres équipes [22] ont été effectuées, d'une part, sans explorer l'état des glandes génitales annexes (prostate, vésicules séminales...) qui constituent l'origine du sélénium au niveau du plasma séminal [23], et d'autre part, sans prendre en considération les habitudes alimentaires. En effet, une supplémentation orale en sélénium augmente son taux au niveau du plasma séminal [24]. Ces facteurs intervenant dans la variation du profil en sélénium peuvent être négligés dans les études comparatives. Par ailleurs, l'influence du sélénium sur les trois paramètres du sperme est différente d'un paramètre à un autre mais elle est plus évidente sur la mobilité. En effet, le sélénium est nécessaire pour la synthèse de la phosphatase hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx). Cette protéine structurale est essentielle pour la mobilité des spermatozoïdes. D'autre part, les études ont montré que la supplémentation en sélénium entraîne une augmentation de la fraction des spermatozoïdes mobiles [25].

Notre étude a montré une baisse significative du calcium séminal chez les témoins par rapport aux patients, alors que la concentration en magnésium est significativement plus élevée chez les témoins. Il a été décrit que le calcium est indispensable pour l'hyperactivation, la capacitation et la réaction acrosomiale [26] ainsi que la mobilité des spermatozoïdes chez les rats. En plus, le dosage de ces deux éléments minéraux est généralement associé au dosage du zinc. En effet, nous avons noté une corrélation faiblement positive mais significative entre le zinc et ces deux éléments minéraux (Ca^{++} et Mg^{++}). Le dosage associé du zinc, calcium et magnésium dans le plasma séminal, n'est pas argumenté seulement par le rôle important joué par ces trois éléments dans la spermatogenèse [27], mais essentiellement par l'existence des granules et des vésicules d'origine prostatique au niveau du plasma séminal. Ces granules jouent un rôle important dans la régulation de la mobilité des spermatozoïdes. Cette régulation se fait par la modulation de la concentration des cations essentiels dans l'environnement

de ces granules. La membrane de ces vésicules contient, en effet, du Mg^{++} et Ca^{++} ATPase dépendant. Le zinc constitue un inhibiteur compétitif pour ces deux cations. Ainsi, une chélation du zinc affecte fortement la mobilité, la réaction acrosomiale et la capacitation.

Le dernier marqueur du stress oxydatif étudié est le malondialdéhyde (MDA) [28-31]. Le dosage de ce dernier est plus utilisé comme moyen d'exploration du stress oxydatif que les autres méthodes comme le dosage des espèces réactives de l'oxygène et celui de l'activité antioxydante totale du milieu étudié. Le MDA constitue l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés induite par les radicaux libres. La sensibilité de ce dosage est bonne mais sa spécificité est discutée. En effet, le MDA peut être formé à partir de composés non lipidiques tels que l'acide ascorbique, les acides aminés, le désoxyribose ou le saccharose [32]. On a noté que la lipoperoxydation est plus élevée chez les patients que chez les témoins. Ce résultat est en accord avec celui d'une autre étude [33] qui a montré que la peroxydation lipidique est élevée chez les hommes ayant une qualité médiocre des spermatozoïdes.

Concernant la mobilité, nous avons noté une augmentation significative du taux séminal en MDA chez les patients par rapport aux témoins. Les spermatozoïdes des sujets atteints d'une asthénospermie semblent être plus affectés par le stress oxydatif. De même, le taux du MDA est plus élevé chez les patients ayant une tératospermie par rapport aux témoins. Il est décrit, par ailleurs, que les spermatozoïdes anormaux ou ayant un reste cytoplasmique produisent d'avantage de radicaux libres. Ils sont ainsi plus exposés que les autres spermatozoïdes à la lipoperoxydation [34]. L'augmentation de la concentration du MDA dans le plasma séminal des trois groupes de patients pourrait refléter les effets pathologiques de la lipoperoxydation sur la mobilité et la survie des spermatozoïdes [35]. En effet, les spermatozoïdes humains ont une membrane cytoplasmique très riche en acides gras polyinsaturés [36]. Ces derniers constituent une cible privilégiée des radicaux libres. Il en résulte ainsi un dysfonctionnement des spermatozoïdes à cause d'une lipoperoxydation [37]. Ceci pourrait expliquer que plus de 40 % des patients infertiles sans cause évidente, ont une activité élevée des radicaux libres [38].

Conclusion

Notre étude confirme les hypothèses qui incriminent le stress oxydatif dans l'altération des caractéristiques spermatozoïdiques et par conséquent dans l'infertilité d'origine masculine. Il semble ainsi que la diminution des concentrations du zinc et du sélénium aurait un rôle dans l'altération des caractéristiques des spermatozoïdes (numération, mobilité, morphologie). Le traitement de cette anomalie par une supplé-

mentation in vitro en éléments trace pourrait ensuite être envisagée. L'effet des éléments trace sur l'assistance médicale à la procréation (essentiellement la fécondation in vitro), dans le cas d'une infertilité d'origine masculine, constituerait une nouvelle voie de recherche.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Marzec-Wróblewska U, Kamiński P, Łakota P (2012). Influence of Chemical Elements on Mammalian Spermatozoa. *Folia Biologica (Praha)* 58:7-15
2. 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. *Biochem J* 333:5-9
3. Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47(suppl 3) 469-74.
4. 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 Histochem Cytobiol* 45(suppl 1):123-6
5. Colagar AH, Marzony ET, Chaichi MJ (2009) Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr Res* 29:82-8
6. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA (2003) Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79:829-43
7. Tavilani H, Doosti M, Saeidi H (2005) Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. *Clin Chim Acta* 356:199-203
8. World Health Organization (1999) WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th edition. Cambridge, UK: Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press 1-86
9. David G., Bisson JP, Czyglik. F, et al (1975) Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain : 1) Proposition pour un système de classification. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 4:17-36
10. Sorensen MB, Bergdahl IA, Hjøllund NH, et al (1999) Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. *Mol Hum Reprod* 5:331-7
11. Yagi K (1976) A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 15:212-6
12. Henkel R, Bitter J, Weber R, et al (1999) Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to mobility. *Fertil Steril* 71:1138-43
13. Chia SE, Ong CN, Chua LH, et al (2000) Comparison of zinc concentration in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J Androl* 21:45-6
14. Prasad AS (1991) Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Am J Clin Nutr* 53:403-12
15. Endre L, Beck F, Prasad A (1997) The role of zinc in human health. *Exp Cell Res* 233:216-24
16. Lewis-Jones DI, Aird IA, Biljan MM, Kingsland CR (1996) Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Hum Reprod* 11:2465-7

17. Kravets FG, Lee J, Singh B, et al (2000) Prostatosomes: current concepts. *Prostate* 43:169–74
18. Yeung CH, Cooper TG, Geyter MD, et al (1998) Studies on the origin of redox enzymes in seminal plasma and their relationship with results of in vitro fertilization. *Mol Hum Reprod* 4 (Suppl 9):835–9
19. Aiken RJ (1997). Molecular mechanism regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod* 3(Suppl 3):169–73
20. Zhao RP, Xiong CL (2005) Zinc content analysis in serum, seminal plasma and spermatozoa of asthenozoospermic and oligo-asthenozoospermic patients. *Zhonghua Nan Ke Xue* 11 (Suppl 9):680–2
21. Vivaqua A, Siciliano L, Sabato M, et al (2004) Prostatosomes as zinc ligands in human seminal plasma. *Int J Androl* 27:27–31
22. Sørensen MB, Bergdahl IA, Hjøllund NH, et al (1999) Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. *Mol Hum Reprod* 5:331–7
23. Wayne CH, Turek PJ (2001) Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. *J Androl* 22:764–72
24. Scott MP, Dixon H (1998) The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol* 82:76–80
25. Xu DX, Shen HM, Zhu O.X, et al (2003) The associations among quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat Res* 534:155–63
26. Frits MF, Barend MG (2000) Dynamic of the mammalian sperm plasma membrane in the process of the fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469:197–235
27. Wong WY, Gert F, Pascal MW, et al (2001) The impact of calcium, magnesium, zinc and cooper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod Toxicol* 15:131–6
28. Storey BT (1997) Biochemistry of the induction and prevention of lipo-peroxidative mechanisms damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 3:203–13
29. Agarwal A, Allamaneni SS (2011) Free radicals and male reproduction. *J Indian Med Assoc* 109:184–7
30. Ben Abdallah F, Dammak I, Attia H, et al (2009). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in infertile men: correlation with semen parameter. *J Clin Lab Anal* 23:99–104
31. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, et al (1996) Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin. *J Androl* 17:530–7
32. Janero DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9:515–40
33. Misro MM, Choudhury L, Upreti K, et al (2004) Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative stress in subjects presenting a normal semen profile. *Int J Androl* 27:82–7
34. Aitken RJ, Krausz C (2001) Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122:497–506
35. Dandekar SP, Nadkarni GD, Kulkarni VS, Puneekar S (2002) Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in mal infertility. *J Postgrad Med* 48:186–9
36. Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Dondero F (1996) Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update* 2:246–56
37. Sharma RK, Agarwal A (1996) Role of reactive oxygene species in male infertility. *Urology* 48:835–50
38. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, et al (2000) Relationship between oxidative, stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing fertility investigation. *Fertil Steril* 73:459–64