

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES  
DE LA TERRE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf : ... /UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2022

# MÉMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME MASTER

Domaine : SNV      Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

M<sup>lle</sup> ARBAOUI Lydia et M. HACENE Younes

## *Thème*

*Rôle des antioxydants dans la protection des cellules  
spermatiques à l'égard de la toxicité engendrée par les  
anticancéreux*

Soutenu le : 07 / 07 / 2022

Devant le jury composé de :

*Nom et Prénom*

*Grade*

M<sup>me</sup> BENAZOUZ Kheira

MAA

Univ.de Bouira

Présidente

M. BOURNINE Lamine

MCA

Univ.de Bouira

Promoteur

M. TIGHILET Karim

MAA

Univ.de Bouira

Examineur

Année universitaire : 2021/2022

## **Remerciements**

*Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier tout d'abord le **Dieu tout puissant** qui nous a donné la volonté, la patience et le courage pour mener à terme ce travail.*

*Nous exprimons notre grande gratitude et nos sincères remerciements à notre promoteur **M. BOURNINE Lamine**, de nous avoir encadré et soutenu tout au long de la préparation de notre mémoire. Nous le remercions aussi pour ses précieux conseils, ses remarques judicieuses, sa gentillesse et sa disponibilité inconditionnelle au laboratoire. Nous chérissons cette bénédiction de travailler avec un précieux encadreur pour apprendre beaucoup de choses en suivant ses conseils et le garderons comme un point de repère. Un grand respect à vous pour toujours. Un grand merci pour la thématique proposée qui est très intéressante et surtout d'actualité.*

*Nos vifs remerciements sont adressés aux membres de jury **M<sup>me</sup> BENAZOUZ Kheira** et **M. TIGHILET Karim** qui nous ont honoré de leurs présences et d'avoir accepté d'évaluer ce travail à sa juste valeur.*

*Nous adressons aussi nos remerciements à **M<sup>me</sup> BOURNINE S.**, pour son suivi, ses orientations, sa disponibilité au laboratoire et sa gentillesse. Nous vous assurons de nos profondes reconnaissances et respects.*

*Toute notre gratitude s'adresse à **M. IGUER-OUADA Mokrane** qui nous a acceptés de réaliser notre stage au sien de son laboratoire. Une belle opportunité pour acquérir un niveau supérieur et plus valorisant, merci pour votre générosité, conseils et encouragements.*

*Nous exprimons aussi notre gratitude à l'ensemble du personnel du laboratoire « Associé en Écosystèmes Marins et Aquacoles » de l'université de Bejaia plus particulièrement **M<sup>lle</sup> BENAMARA** qui nous a bien aidé et orienté.*

*Nos remerciements s'adressent également à **tous nos enseignants** pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve et de leurs accompagnements tout au long de notre cursus universitaire malgré leurs charges académiques et professionnelles.*

*Enfin, nos sincères remerciements à toute personne qui nous a aidés de près ou de loin dans la réalisation de ce travail. Merci infiniment à tous.*

**Merci**

## *Dédicaces*

*A mes très chers parents. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avais pas cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Que DIEU vous protège.*

*A mes très chères frères Nassim et Ghilas.*

*A la mémoire de mon grand frère Yanis, je prie ALLAH de l'accepter avec sa miséricorde dans son vaste paradis.*

*A mon binôme Lydia et à M<sup>lle</sup>. BENAMARA que je remercie vivement pour leur aide et soutien durant la réalisation de ce travail.*

*A mes chères amies C. Tarek, L. Abdessalam, M. Ahmed et H. Khalef.*

*A toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien tant moral que physique et qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail...*

*Je dédie ce travail*

***Younes***

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour ;*

*A ma chère maman, celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoir, à la source d'un amour incessible, à tes prières qui m'ont soutenu tout au long de mes études. Merci d'être à mes côtés, cela a toujours été ma source de force pour affronter divers obstacles dans ma vie. A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation et de ses dévouements.*

*A mon cher papa, celui qui a changé la nuit en jour pour m'assurer les bonnes conditions, Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection. Merci mes parents pour tous vos sacrifices, amour et vos soutiens. Que dieu le tout-puissant vous protège et vous donne la bonne santé.*

*A ma chère sœur Sabrina qui ma continuellement soutenu et encouragé dans ma vie et mes études. Que Dieu vous guérisse et vous donne la bonne santé ma belle-sœur. Je te souhaite une vie pleine de joie et de réussite.*

*A mon adorable frère Adem, qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille. Que dieu vous protège et je vous souhaite une réussite à ton examen du baccalauréat, cette année.*

*A mon grand-père, qui ne cesse de me soutenir, m'encourager durant tout mon cursus, que Dieu vous protège mon cher grand père et vous accorde une longue vie.*

*A tous mes amis (es) pour leurs aides et leurs amitiés Syphax, Nourelhouda, Maha ...*

*Sans oublier toute la promo M2 biochimie appliquée et aussi mes enseignants pour leurs gentillesse et leurs respects y compris M<sup>me</sup> Benbara, M<sup>r</sup> Chargui, Kādri....*

*A mon petit ami qui a été à mes côtés à tout moment dont j'ai besoin et m'encourager de continuer et d'avoir des meilleures notes tout au long de mes études. Merci*

*A tous mes oncles et ma seul tante Salîha et ses enfants Leticia et Rayane.*

*A mon cher binôme Younes, pour ton soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail. Je te souhaite une vie pleine de joie et de réussite.*

**Lydia**

## Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

### *Synthèse Bibliographique*

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>I. La chimiothérapie antinéoplasique.....</b>	<b>3</b>
<b>I.1. Généralités sur la chimiothérapie .....</b>	<b>3</b>
<b>I.2. Les médicaments antinéoplasiques .....</b>	<b>3</b>
<b><i>I.2.1. Les différentes classes de médicaments antinéoplasiques et leurs mécanismes d'actions.....</i></b>	<b>3</b>
<b><i>I.2.2. Généralités sur les agents alkylants .....</i></b>	<b>5</b>
<b><i>I.2.3. Les dérivés de platines .....</i></b>	<b>6</b>
<b><i>I.2.3.1. Cisplatine .....</i></b>	<b>7</b>
<b><i>I.2.3.2. Carboplatine.....</i></b>	<b>8</b>
<b><i>I.2.3.3. Oxaliplatine .....</i></b>	<b>8</b>
<b>I.3. La toxicité des médicaments antinéoplasiques .....</b>	<b>8</b>
<b><i>I.3.1. Toxicité aiguë ou immédiate .....</i></b>	<b>9</b>
<b><i>I.3.2. Toxicité chronique ou retardée .....</i></b>	<b>9</b>
<b>II. La stérilité masculine induite par les agents de chimiothérapie.....</b>	<b>11</b>
<b>II.1. Généralités sur l'organe reproducteur masculin et la spermatogenèse.....</b>	<b>11</b>
<b><i>II.1.1. Structure et fonction du testicule .....</i></b>	<b>11</b>
<b><i>II.1.2. Les constituants du sperme .....</i></b>	<b>12</b>
<b><i>II.1.3. La spermatogenèse et le spermatozoïde .....</i></b>	<b>12</b>
<b><i>II.1.3.1. Les étapes de la spermatogenèse .....</i></b>	<b>12</b>
<b><i>II.1.3.2. La régulation de la spermatogenèse .....</i></b>	<b>14</b>
<b><i>II.1.3.3. La structure du spermatozoïde.....</i></b>	<b>14</b>
<b><i>II.1.3.4. La composition membranaire du spermatozoïde .....</i></b>	<b>15</b>
<b>II.2. L'infertilité masculine .....</b>	<b>15</b>
<b><i>II.2.1. Définition de l'infertilité .....</i></b>	<b>15</b>
<b><i>II.2.2. Classification de l'infertilité masculine.....</i></b>	<b>16</b>
<b><i>II.2.2.1. Azoospermie .....</i></b>	<b>16</b>

II.2.2.2. <i>Infertilité coïtale</i> .....	16
<b>II.2.3. Le bilan de l'infertilité masculine</b> .....	<b>16</b>
II.2.3.1. <i>L'analyse du sperme</i> .....	17
II.2.3.2. <i>Le spermocytogramme</i> .....	18
<b>II.3. L'étiologie de l'infertilité masculine</b> .....	<b>18</b>
<b>II.4. Les effets des anticancéreux sur la fonction des gonades masculins</b> .....	<b>18</b>
<b>III. La relation entre le stress oxydant, le système antioxydant et le spermatozoïde</b> .....	<b>22</b>
<b>III.1. Le stress oxydant</b> .....	<b>22</b>
III.1.1. <i>Le stress oxydant et ses sources</i> .....	22
III.1.2. <i>Les effets du stress oxydant sur la cellule spermatique</i> .....	23
III.1.2.1. <i>Les effets sur la membrane plasmique du spermatozoïde</i> .....	23
III.1.2.2. <i>Les effets sur les protéines spermatiques</i> .....	25
III.1.2.3. <i>Les effets sur l'ADN spermatique</i> .....	25
III.1.2.4. <i>Les effets sur la mobilité du spermatozoïde</i> .....	25
III.1.3. <i>Les différents tests pour mesurer les espèces réactives de l'oxygène dans le sperme</i> .....	26
<b>III.2. La protection par les antioxydants</b> .....	<b>26</b>
III.2.1. <i>La définition et la classification des antioxydants</i> .....	27
III.2.1.1. <i>Les antioxydants enzymatiques</i> .....	27
III.2.1.2. <i>Les antioxydants non enzymatiques</i> .....	28
III.2.2. <i>La thérapie antioxydante</i> .....	30

## *Partie pratique*

<b>I. Matériel et méthodes</b> .....	<b>32</b>
<b>I.1. Matériel</b> .....	<b>32</b>
I.1.1. <i>Matériel biologique</i> .....	32
I.1.2. <i>Appareillage et produits chimiques utilisés</i> .....	32
<b>I.2. Méthodes</b> .....	<b>35</b>
I.2.1. <i>Préparation de la solution TRIS</i> .....	35
I.2.2. <i>Préparation et traitement du sperme</i> .....	36
I.2.3. <i>Préparation de solution d'anticancéreux</i> .....	36
I.2.4. <i>Préparation des solutions des antioxydants</i> .....	36
I.2.4.1. <i>Préparation de la solution de la vitamine C</i> .....	36

---

<i>I.2.4.2. Préparation de la solution de la vitamine E</i> .....	36
<b><i>I.2.5. Mode opératoire</i></b> .....	<b>36</b>
<i>I.2.5.1. Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes</i> .....	36
<i>I.2.5.2. Test du dosage des malondialdéhydes</i> .....	38
<i>I.2.5.3. Analyse statistique</i> .....	40
<b>II. Résultats</b> .....	<b>41</b>
<b>II.1. Effet protecteur des vitamines C, E seuls ou combinés sur la motilité spermatique à l'égard de l'effet délétère du carboplatine</b> .....	<b>41</b>
<b>II.2. Effet du carboplatine et des vitamines C et E sur l'induction de la peroxydation lipidique dans les spermatozoïdes</b> .....	<b>43</b>
<b>III. Discussion</b> .....	<b>44</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>49</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>50</b>
<b>Résumé</b>	

**Liste des abréviations**

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AGPI</b>	Acides gras polyinsaturés
<b>ATP</b>	Adénosine-triphosphate
<b>CASA</b>	Analyseur de sperme assisté par ordinateur
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CBDCA</b>	Carboplatine
<b>CDDP</b>	Cisplatine
<b>EDTA</b>	Acide éthylène-diamine tétra acétique
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>FSH</b>	Hormone folliculo stimulante
<b>G-6-PDH</b>	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
<b>Gn-RH</b>	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydase
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>IBT</b>	Test de fixation des immunobilles
<b>ICSI</b>	Injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde
<b>IUI</b>	Insémination intra-utérine
<b>IVF</b>	Fertilisation <i>in vitro</i>
<b>LH</b>	Hormone lutéinisante
<b>L-OHP</b>	Oxaliplatine
<b>MAR</b>	Réaction anti-globuline mixte
<b>MDA</b>	Malondialdéhyde
<b>NADH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NaOH</b>	Hydroxyde de sodium



---

<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>PL</b>	Peroxydation lipidique
<b>PR</b>	Motilité rapide progressive
<b>SO</b>	Stress oxydant
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>SPZ</b>	Spermatozoïde
<b>TBA</b>	Acide thiobarbiturique
<b>TBARS</b>	Test du dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique
<b>TCA</b>	Acide trichloracétique
<b>TRIS</b>	(Hydroxyméthyl) aminométhane
<b>VAP</b>	Vitesse moyenne de trajet
<b>VCL</b>	Vitesse curviligne
<b>VC</b>	Vitamine C
<b>VCE</b>	Vitamine C + vitamine E
<b>VE</b>	Vitamine E
<b>VSL</b>	Vitesse en ligne droite

---

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Cibles des principaux anticancéreux cytotoxiques .....	5
<b>Figure 02</b> : Les différents types de produits d'alkylation induits par les agents alkylants monofonctionnels (a–c) ou bifonctionnels (d–h).....	6
<b>Figure 03</b> : Déformation de l'ADN induite par des agents alkylants.....	7
<b>Figure 04</b> : Structures chimique du cisplatine, carboplatine et oxaliplatine.....	8
<b>Figure 05</b> : Vue anatomique schématique du testicule .....	11
<b>Figure 06</b> : Anatomie des tubules séminifères adultes sains .....	13
<b>Figure 07</b> : Représentation schématique d'un spermatozoïde humain mature montrant ses composants, la tête, la pièce médiane et la queue.....	14
<b>Figure 08</b> : Explication schématique de l'implication du stress oxydant chimio-induit sur la reproduction et la fertilité masculine .....	21
<b>Figure 09</b> : Les étiologies physiologiques et pathologiques de la génération d'espèces réactive à l'oxygène.....	23
<b>Figure 10</b> : La peroxydation lipidique .....	24
<b>Figure 11</b> : Aperçu des différentes espèces réactif de l'oxygène et des antioxydants régulateurs de leur production .....	28
<b>Figure 12</b> : Les voies de l'oxydation et de la régénération de la vitamine E .....	29
<b>Figure 13</b> : Photographie de l'analyseur CASA .....	34
<b>Figure 14</b> : Certains paramètres cinétiques du sperme mesurés par le système CASA ..	35
<b>Figure 15</b> : Capture d'écran du logiciel « Sperm Class Analyzer ».....	37
<b>Figure 16</b> : Protocole de l'étude de l'effet protecteur des antioxydants à l'égard de la toxicité induite par le carboplatine sur les spermatozoïdes matures .....	38
<b>Figure 17</b> : Protocole de la peroxydation lipidique (test TBARS) .....	39
<b>Figure 18</b> : Formation de complexe 2TBA-1MDA.....	41
<b>Figure 19</b> : Les paramètres de mobilité spermatique (VAP, VSL, VCL et % des PR) après incubation des spermatozoïdes avec le carboplatine prétraité par les vitamines C, E seuls ou combinés pendant (T0 : 0 min, T1 : 30 min et T2 : 60 min).....	42

**Figure 20** : Taux de malondialdéhydes produits par les spermatozoïdes après différents traitements .....43

---

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Les agents utilisés en chimiothérapie et leurs mécanismes d'action .....	4
<b>Tableau 02</b> : Évaluation clinique de l'infertilité masculine .....	17
<b>Tableau 03</b> : Valeurs normales du spermogramme selon l'Organisation Mondiale de la Santé .....	17
<b>Tableau 04</b> : Risques des principaux anticancéreux sur la fertilité masculine.....	19
<b>Tableau 05</b> : Effets de l'exposition à la chimiothérapie sur la fertilité masculine chez l'homme .....	20
<b>Tableau 06</b> : Exemples de tests directs et indirects utilisés pour mesurer l'oxydation ..	26
<b>Tableau 07</b> : Les antioxydants, leurs caractéristiques et leurs effets sur les paramètres du sperme.....	30
<b>Tableau 08</b> : Les produits et le matériel utilisés dans l'expérimentation .....	32

# *Introduction*

## Introduction

Le cancer est l'un des fléaux les plus vulnérables de notre ère. Il est caractérisé par une prolifération incontrôlée de cellules, liée à un échappement aux mécanismes de régulation qui assure le développement harmonieux de notre organisme. Ces cellules dérégées forment une masse appelée tumeur maligne. Celles-ci sont susceptibles de se détacher de la tumeur et d'envahir les tissus voisins, à travers les vaisseaux sanguins et lymphatiques, pour aller former d'autres tumeurs (métastases). En effet, avoir recours à la chirurgie, la chimiothérapie et/ou la radiothérapie sont l'une des thérapies utilisées pour traiter ou éradiquer le cancer (Nussbaumer *et al.* 2011).

La chimiothérapie est aujourd'hui l'un des traitements anticancéreux les plus appropriés. Cette thérapie fait recours à l'utilisation des substances chimiques cytotoxiques ayant pour but d'anéantir la division cellulaire et d'induire ainsi l'apoptose des cellules cancéreuses (Chevreau *et al.* 1995). Ces substances cytotoxiques dites agents anticancéreux ou antinéoplasiques peuvent être classées en fonction de leur mode d'action. Parmi ces agents, les plus utilisés sont : les molécules à action directe sur l'ADN (agents alkylants, agents intercalants et inhibiteurs de topoisomérases), les molécules agissant sur la synthèse de l'ADN (antimétabolites) et les molécules ayant une action sur la mitose (agents antimicrotubules) (Guichard *et al.* 2017). Bien que les médicaments anticancéreux sont efficaces, néanmoins, ils sont dotés des effets secondaires. Cela est due à leur cytotoxicité sur les cellules et les tissus normaux (agents non sélectifs) (Haghi-Aminjan *et al.* 2018). Le système reproducteur est l'un des organes vulnérables à la chimiothérapie dont le traitement peut entraîner une altération de la fertilité (Haghi-Aminjan *et al.* 2018).

L'infertilité humaine est reconnue par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme une maladie du système reproducteur ayant, actuellement, une prévalence estimée à 15 % de couples touchés dans le monde. Les spécialistes pensent que l'infertilité survenue dans la moitié des couples infertiles est d'origine masculine (Ribas-Maynou *et al.* 2020). Pour les patients cancéreux, l'infertilité est l'une des complications les plus courantes en raison de l'effet gonadotoxique de la majorité des anticancéreux (Yamaguchi *et al.* 2011). La plupart de ces agents ne ciblent que les cellules en prolifération rapide principalement les spermatogonies de type B (Schrader *et al.* 2001).

A cet effet, la majorité des travaux réalisés s'intéressent à l'étude de l'effet des agents anticancéreux sur les cellules souches. Le degré de dysfonctionnement gonadique semble être spécifique au médicament, lié à la dose, la qualité initiale du sperme et l'étape ciblée par la toxicité dans la spermatogénèse (Vakalopoulos *et al.* 2015).

Cependant, la plupart des études entreprises révèlent que le stress oxydant (SO) est le principal mécanisme par lequel les agents anticancéreux induisent une toxicité dans les testicules des mammifères. De cette manière, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ont été largement étudiées comme l'un des principaux médiateurs de l'infertilité masculine (Choudhary *et al.* 2010, Shati 2019, Takeshima *et al.* 2019).

Le rôle du système antioxydant est essentiel pour faire face à la production excessive des ERO gardant ainsi l'équilibre rédox (Barati *et al.* 2020). Par conséquent, l'utilisation thérapeutique des antioxydants pour contrecarrer le SO, est l'une des thérapies les plus prometteuses pour réduire les dommages oxydatifs et de prévenir ainsi l'infertilité masculine chimio-induite (Ghafouri-Fard *et al.* 2021). Néanmoins, l'impact des anticancéreux sur les spermatozoïdes (SPZ) matures *in vitro* ainsi que l'effet protecteur des antioxydants à l'égard de leur toxicité sont ou insuffisamment décrits dans la littérature. En effet, seulement deux études ont été réalisées dans ce contexte, la première à démontrer l'effet de certains anticancéreux sur la mobilité spermatique (Hong *et al.* 1985) et la seconde à révéler l'effet protecteur de la N-acétylcystéine à l'égard des dommages engendrés par l'étoposide sur les SPZ (Baetas *et al.* 2019).

C'est dans cette optique, que nous avons arrêté notre objectif de travail qui consiste : premièrement, à étudier la toxicité des anticancéreux sur les SPZ matures et deuxièmement, à évaluer l'effet protecteur des antioxydants à savoir la vitamine E (VE) et la vitamine C (VC), seules ou combinées à l'égard de cette toxicité. Le fait que la mobilité des SPZ est révélatrice de leur état physiologique et des impacts négatifs qu'ils subissent, les rend comme modèle cellulaire exemplaire à étudier. Pour cela, nous allons entreprendre la mesure de certains paramètres de la mobilité spermatique, tels que la vitesse en ligne droite (VSL), la vitesse curviligne (VCL), la vitesse moyenne du trajet (VAP) ainsi que le pourcentage des progressifs rapides (% PR). Cependant, l'effet protecteur des antioxydants utilisés à l'égard du SO chimio-induit a été déterminé par la mesure des malondialdéhydes (MDA), produits de la peroxydation des lipides membranaires.

# *Synthèse Bibliographique*



## I. La chimiothérapie antinéoplasique

### I.1. Généralités sur la chimiothérapie

La chimiothérapie est une approche nettement différente de la chirurgie et de la radiothérapie pour traiter le cancer. Plutôt que d'enlever physiquement une tumeur ou une partie de celle-ci, la chimiothérapie utilise des agents chimiques (médicaments anticancéreux ou cytotoxiques) de faible poids moléculaire pour éradiquer les cellules cancéreuses. Cette chimiothérapie agit quel que soit l'endroit où elles se trouvent la tumeur dans le corps, ou au moins limiter leur prolifération afin d'augmenter l'espérance de vie du patient et de réduire les douleurs dû aux métastases formées. Cette méthode thérapeutique est entièrement adaptée à chaque patient, en fonction des caractéristiques de la tumeur à traiter (Nussbaumer *et al.* 2011).

### I.2. Les médicaments antinéoplasiques

Les médicaments antinéoplasiques sont également appelés les médicaments anticancéreux, agents de chimiothérapie ou cytotoxiques visent à détruire les cellules en division rapide de différents cancers. Ces médicaments sont administrés sous différentes formes. Certains sont des liquides qui sont injectés aux patients et d'autres sont des comprimés que les patients doivent prendre. Mais le plus souvent ils sont administrés par voie intraveineuse. De ce fait, la chimiothérapie est considérée comme une thérapie systémique car les médicaments se diffusent rapidement dans la circulation sanguine de tout l'organisme pour atteindre les cellules cancéreuses (Smith *et al.* 2017). Dans la plupart des cas, les protocoles de chimiothérapie utilisent ces médicaments seuls ou combinés (Thurston *et al.* 2021).

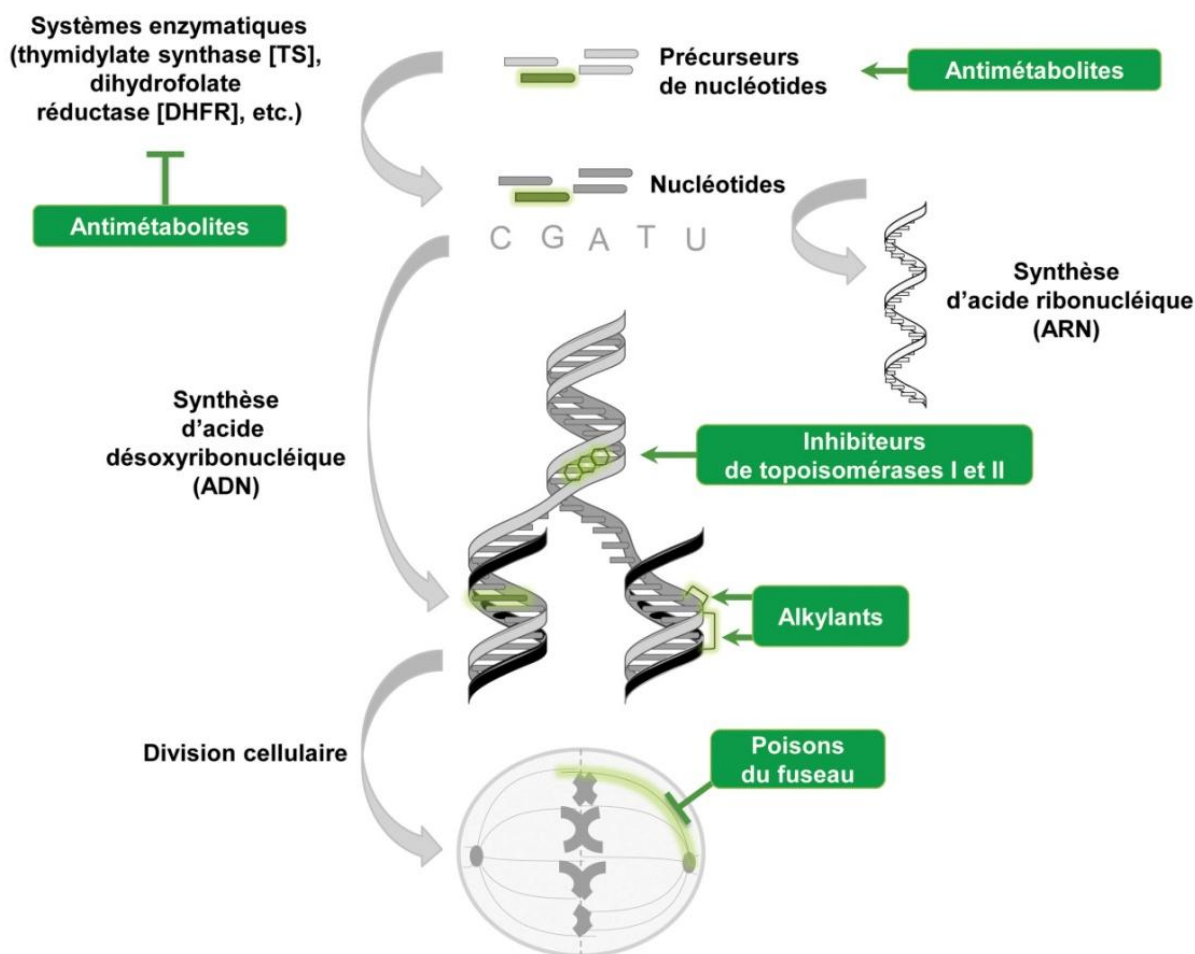
#### *I.2.1. Les différentes classes de médicaments antinéoplasiques et leurs mécanismes d'actions*

Les médicaments anticancéreux sont divisés en plusieurs groupes et classes selon leur mode d'action, leur structure chimique, leur composition et leur homologie avec d'autres médicaments. Certains peuvent appartenir à plus d'une classe car ils peuvent avoir plusieurs modes d'action. L'étude du mode d'action d'un médicament anticancéreux permet de déterminer ses effets secondaires. Ces informations peuvent ensuite être incorporées par les oncologues pour définir l'efficacité d'un médicament (Abbas *et al.* 2018). Les anticancéreux les plus couramment utilisés sont illustrés dans le **tableau 01**.

**Tableau 01** : Les agents utilisés en chimiothérapie et leurs mécanismes d'action (Faure 2010, Bardal *et al.* 2011, Guichard *et al.* 2017, Abbas *et al.* 2018).

Classe des anticancéreux	Exemples d'anticancéreux	Mécanisme d'action	Cancer Traité
<b>Agents alkylants</b>	-Cyclophosphamide -Ifosfamide -Chlorambucil -Sels de platine (cisplatine, carboplatine, oxaliplatine)	Composés organiques possédant un ou plusieurs groupements alkyles électrophiles réagissant de manière covalente avec le groupement nucléophile de certaines bases d'ADN, inhibant ainsi sa transcription et sa réplication, entraînant des lésions cellulaires létales	Lymphome, leucémie, la maladie de Hodgkin, sarcomes, cancer de sein, et du testicule...
<b>Antimétabolites</b>	-Antipirimidiques (5 fluorouracile, Gemcitabine,) -Antifoliques (méthotrexate)	-Analogues structuraux des bases puriques, pyrimidiques et coenzymes foliniques -Interfèrent dans la synthèse des acides nucléiques, en inhibant les enzymes clés de celle-ci ou s'incorporant au sein de l'ADN	Leucémie, cancers de l'ovaire, du sein, du tractus intestinal et divers autres
<b>Agents intercalants</b>	-Anthracyclines (doxorubicine) -Epirubicine	-Molécules polycycliques qui s'insèrent entre les paires de bases contiguës d'ADN -Ils ont une action directe sur les topoisomérases II et I, provoquant ainsi l'inhibition de la réplication et la transcription de l'ADN	Cancer des os, Lymphome hodgkinien, Cancer du rein, Leucémie
<b>Agents scindants</b>	Bléomycine	Molécules qui agissent à la formation des radicaux libres responsables de multiples cassures d'ADN et d'inhibition des mécanismes de réplication et de transcription	Cancer des os, Lymphome de Hodgkin   Suivre le tableau 01
<b>Inhibiteurs de la topoisomérase I</b>	Dérivés de la camptothécine (Irinotécan et Topotécan)	Topoisomérases I et II sont des enzymes qui contrôlent la structure topologique de l'ADN en générant respectivement des cassures mono ou double brin. L'inhibition de ces enzymes prive la cellule d'utiliser ses informations génétiques, par le blocage de l'étape de refermeture de l'ADN ce qui conduit à la mort cellulaire	Leucémie, Cancers de l'ovaire, gastro-intestinal, du poumon...
<b>Inhibiteurs de la topoisomérase II</b>	Anthracyclines (doxorubicine, étoposide)		

La **figure 01** représente les principales cibles des différents groupes d'anticancéreux.



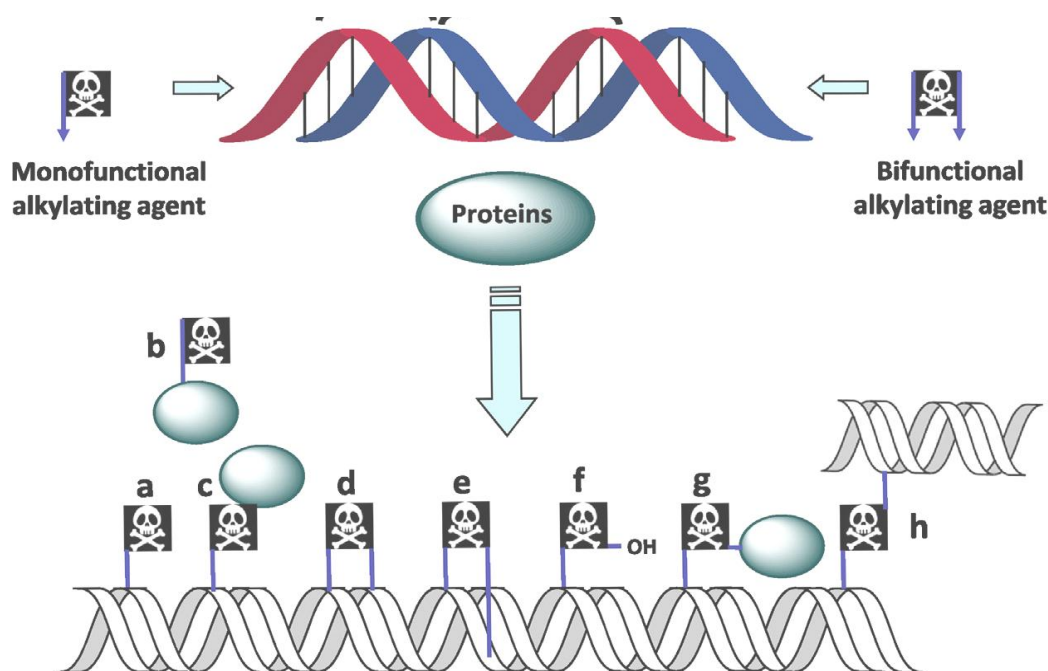
**Figure 01** : Cibles des principaux anticancéreux cytotoxiques (Faure 2010).

### 1.2.2. Généralités sur les agents alkylants

Les agents alkylants représentent la plus ancienne famille de médicaments antinéoplasiques après la première utilisation thérapeutique de la chlorméthine (Guichard *et al.* 2017). Dans les années 1940, deux éminents pharmacologues de Yale, Alfred Gilman et Louis Goodman ont examiné les effets thérapeutiques des agents moutarde dans le traitement du lymphome. Tout d'abord, ils ont établi des lymphomes chez la souris et ont montré que les tumeurs pouvaient être traitées avec des agents moutarde (DeVita *et al.* 2008). De ce fait, les moutardes d'azotes agissent en établissant des liaisons covalentes avec diverses molécules biologiques qu'ils rencontrent, en particulier l'ADN, ce qui perturbe la synthèse des protéines et la division cellulaire. Les groupements les plus sensibles à l'activité de ces agents sont retrouvés dans une chaîne linéaire ou dans un cycle (- SH ; - OH ; - COOH ; - NH<sub>2</sub> et - NH) comme ceux des bases puriques et pyrimidiques ainsi que les phosphates des liaisons phosphodiester de l'ADN. Cette sensibilité est due en général à un proton mobile qui peut

s'échanger contre un groupement alkyl. L'azote de la guanine est la cible principale de l'alkylation puisqu'il possède le plus haut potentiel électrophile de l'ADN (Todd *et al.* 2018).

Les agents alkylants peuvent être classés selon leurs interactions covalentes avec les bases nucléiques de l'ADN, en deux types (**figure 02**) soit en agents alkylants monofonctionnels (n'ayant qu'une seule liaison chimique avec l'ADN), ou bien bifonctionnels (créent des ponts soit entre deux bases d'un même brin, ou entre deux bases de deux brins complémentaires, avec l'agent alkylant).



**Figure 02 :** Les différents types de produits d'alkylation induits par les agents alkylants monofonctionnels (a–c) ou bifonctionnels (d–h) (Puyo *et al.* 2014).

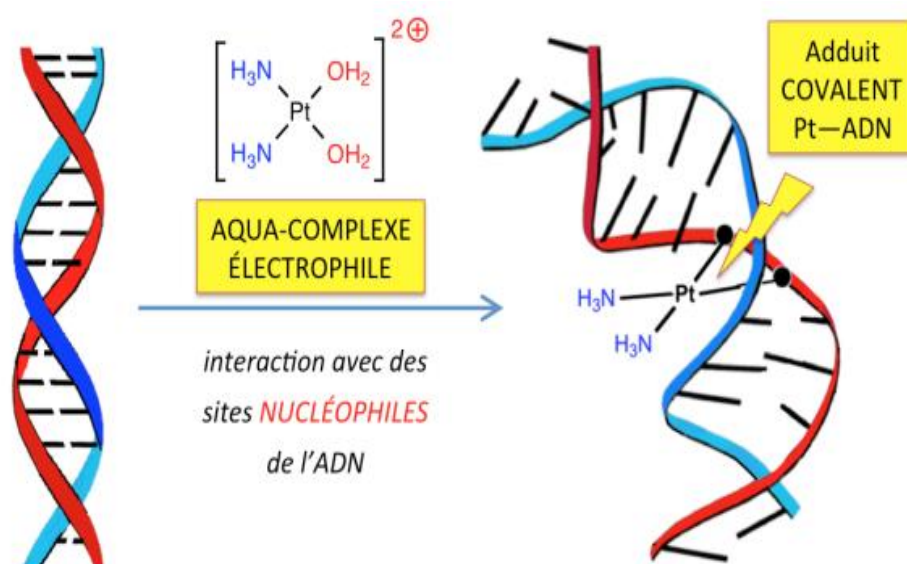
Aujourd'hui, il existe 7 classes d'agents alkylants « standards » couramment utilisés en chimiothérapie, tels que : les moutardes à l'azote (le cyclophosphamide), éthylène-imines (thiotépa), alkyl-sulfonates (busulfan), triazènes (dacarbazine, procarbazine, ...), nitroso-urées (carmustine), les dérivés de platines (le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine) (Faure 2010).

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des agents alkylants, en particulier les dérivés de platines car ils font partis des agents anticancéreux les plus prescrits et ils sont utilisés pour traiter plusieurs types de tumeurs humaines.

### ***1.2.3. Les dérivés de platines***

Les dérivés de platines sont des composés appartenant à la classe des agents alkylants. L'action des platines est homologue à celle des moutardes azotées. Ce sont des petites

molécules très réactives, qui agissent en créant des ponts intra ou inter brins au niveau de l'ADN. Les trois molécules qui la composent sont le cisplatine (CDDP), le carboplatine (CBDCA) et l'oxaliplatine (L-OHP), elles partagent des propriétés physicochimiques et pharmacologiques, en particulier la formation des adduits au niveau de l'ADN cellulaire. Cela inhibe la transcription et la réplication de l'ADN entraînant ainsi des lésions cellulaires létales (Chatelut 2011). À la différence des agents alkylants classiques qui forment des liaisons azote-carbone, ces médicaments sont responsables d'adduits de type azote-métal (Colvin 2003). En milieu aqueux, la dissociation de dérivés de platine se traduit par la libération de deux atomes de chlore. Les deux valences libres se fixent alors sur les sites actifs des molécules d'ADN et forment des ponts intra ou inter brins entre les deux chaînes de l'ADN (**figure 03**).



**Figure 03** : Déformation de l'ADN induite par des agents alkylants (Descôteaux 2013).

### 1.2.3.1. Cisplatine

Le CDDP ou cis-diamminedichloridoplatinum (II) est un sel de platine exerçant une activité anticancéreuse via de multiples mécanismes. Le mécanisme le plus impliqué est la génération des adduits de l'ADN nucléaire et mitochondrial en interagissant d'une manière sélective, après la perte de deux ions chlorure, avec les bases puriques d'ADN (Adénine ou Guanine). Cela induit une modification de la conformation locale du double brin d'ADN suivie d'une activation de plusieurs voies de transduction du signal qui conduisent finalement à l'apoptose. Cependant, les effets secondaires et la résistance aux médicaments comme l'inactivation du médicament en réagissant avec le glutathion (GSH), sont les deux défis inhérents du CDDP qui limitent ainsi son application et son efficacité. Pour minimiser ces

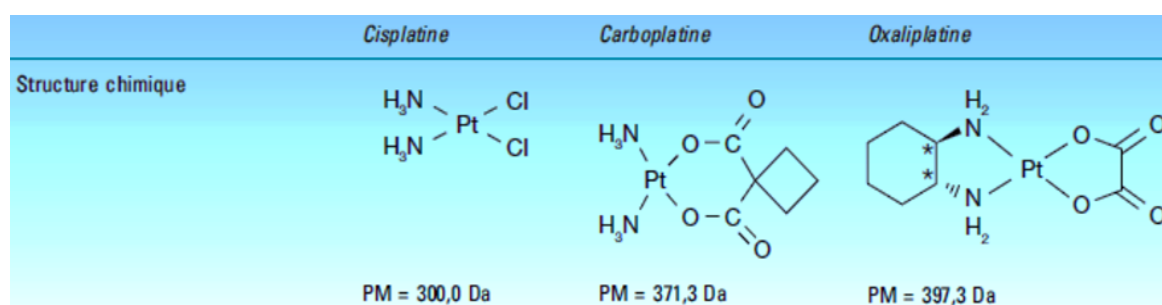
effets, des thérapies combinées sont utilisées et se sont avérées plus efficaces pour traiter les cancers (Ghosh 2019).

### 1.2.3.2. Carboplatine

Le CBDCA ou Diamine-[1,1-cyclobutyldicarboxylatoplatine], est un composé organométallique du platine utilisé comme une molécule anticancéreuse. En effet, des études ont montré que la principale voie de sa réaction implique l'attaque directe par des nucléophiles via l'ouverture de son cycle et la liaison avec les constituants de l'ADN. Cette molécule est un analogue de deuxième génération du CDDP, il partage plusieurs propriétés structurales et pharmacologiques avec celui-ci, il diffère par cyclobutyldicarboxylato. Ce qui suggère que ce composé possède moins d'effets secondaires. En raison du spectre réduit de leur effets, le CBDCA est mieux toléré par les patients et peut être utilisé à des doses plus élevées que le CDDP (Ali *et al.* 2013).

### 1.2.3.3. Oxaliplatine

La L-OHP ou cis- [oxalato (trans 1-1-1,2-DACH) platine] est un énantiomère unique issu de la complexation d'un atome de platine avec le 1,2-diaminocyclohexane (DACH) et un groupe oxalate (**figure 04**). L'inhibition de la synthèse et la réplication de l'ADN survient par formation de ponts intra brins entre deux guanines adjacentes avec le ligand DACH hydrophobe volumineux pointant dans le sillon d'ADN et empêche ainsi la liaison de l'ADN. De plus, le ligand oxalate est également connu pour réduire la toxicité des effets secondaires du médicament par rapport au CDDP (Ali *et al.* 2013).



**Figure 04** : Structures chimique du cisplatine, carboplatine et oxaliplatine (Thomas *et al.* 2007)

## I.3. La toxicité des médicaments antinéoplasiques

Le traitement de chimiothérapie implique l'usage des médicaments toxiques dans le but de tuer les cellules tumorales. Cependant, dans certains cas, ces composés ont la propriété d'agir aussi sur les cellules saines à prolifération rapide dû au manque de sélectivité et la non-

spécificité de leur action, ce qui provoque des effets secondaires tels que : les nausées, vomissements, mucite, diarrhée ou constipation, alopecie, fatigue, lymphopénie, thrombopénie, l'aménorrhée ou l'azoospermie...etc. Ces effets sont directement liés au type de médicaments administrés, à leurs doses, à leur association avec d'autres médicaments, à la réaction de chaque patient, ainsi qu'à son état de santé (Airley 2009, Allen *et al.* 2018). Chaque médicament possède une toxicité particulière et altère différentes cellules. On distingue deux types de toxicités comme :

### ***1.3.1. Toxicité aiguë ou immédiate***

Survenant quelques heures ou quelques jours après la première administration du médicament, elle est en général réversible. On distingue 3 grands types de toxicité: toxicités hématologiques, toxicité gastro-intestinale, toxicité dermatologique et sur les phanères (la chute des cheveux, atteinte des ongles, hyperpigmentation cutanée) (Airley 2009).

### ***1.3.2. Toxicité chronique ou retardée***

La toxicité chronique provoque des effets indésirables qui peuvent survenir des semaines, des mois, voire des années après le traitement. On distingue des toxicités spécifiques en fonction des molécules thérapeutiques causant des dommages aux organes du corps (néphrotoxicité, neurotoxicité, cardiotoxicité, reprotoxicité...) (Airley 2009, Oun *et al.* 2018).

**A) Néphrotoxicité :** elle est induite par les différents anticancéreux, elle peut se manifester par une insuffisance rénale aiguë ou chronique, une dysfonction tubulaire, une protéinurie ou même une hypertension artérielle. Selon les patients, la néphrotoxicité peut être réversible ou non. De ce fait, le traitement de la chimiothérapie nécessite une surveillance avant, pendant et après le traitement (Oun *et al.* 2018).

**B) Cardiotoxicité :** les patients recevant de la chimiothérapie conventionnelle, en particulier les anthracyclines, ont un risque d'avoir des problèmes de fonctionnement du cœur et des anomalies du rythme cardiaque (arythmie), une ischémie cardiovasculaire, et une hypertension artérielle. Dans ces situations, une surveillance cardiaque spécifique doit être mise en place et les examens doivent être répétés à intervalles réguliers pendant le traitement (Dumas *et al.* 2016).

**C) Toxicité gonadique ou la reprotoxicité :** les anticancéreux peuvent être des substances toxiques pour la reproduction ; affectant la fonction sexuelle et la fertilité des hommes et des femmes adultes par une toxicité directe sur les gonades ou le système

reproducteur, ce qui entraînent ainsi des effets indésirables sur le développement de leurs descendants. Les lésions gonadiques d'origine médicamenteuse sont une cause importante d'infertilité. Une telle altération est souvent imprévisible et peut-être réversible si l'agent incriminé est arrêté (Fody *et al.* 1985). Le mécanisme exact de cette reprotoxicité est incertain mais semble impliquer l'épuisement du pool de cellules germinales proliférant, en tuant les cellules non seulement au stade de la différenciation des spermatogonies mais aussi des cellules souches, provoquant ainsi une azoospermie temporaire ou permanente chez l'homme. Il provoque aussi une réduction du nombre de follicules ovariens causés par les anticancéreux, perturbant le cycle menstruel des femmes ce qui provoque une aménorrhée ou une ménopause précoce conduisant à l'infertilité féminine (Vassilakopoulou *et al.* 2016).

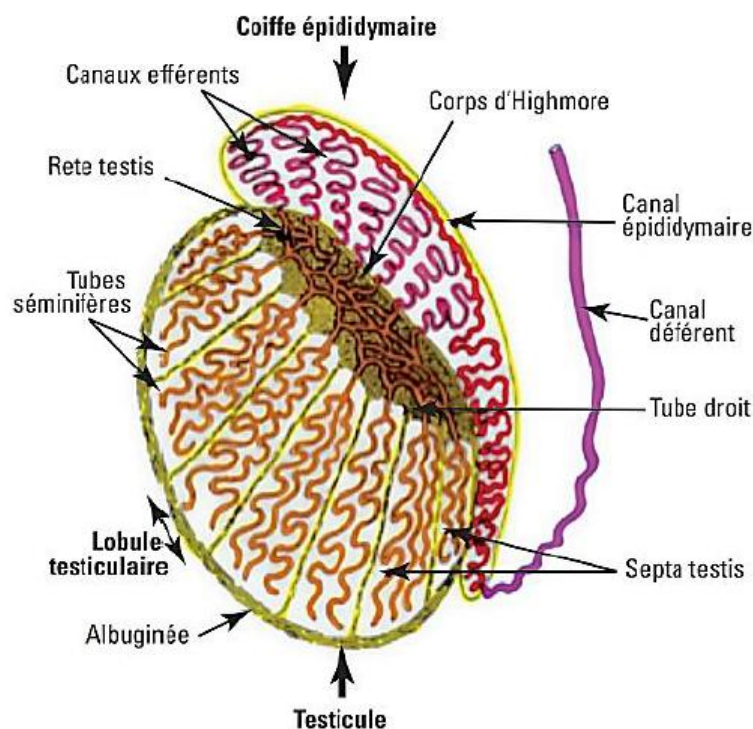


## II. La stérilité masculine induite par les agents de chimiothérapie

### II.1. Généralités sur l'organe reproducteur masculin et la spermatogenèse

#### II.1.1. Structure et fonction du testicule

Le testicule est un organe bi-compartmental entouré d'une capsule fibreuse, la tunique albuginée, reliée aux muscles rétracteurs et fortement vascularisée (**figure 05**). Il est composé de tubes séminifères (environ 90 % de la masse adulte) et d'un interstitium / espace interstitiel (environ 10 % de la masse adulte). La paroi tubulaire est constituée d'une membrane basale avec contractile sous-jacent des cellules péritubulaires. Les tubes abritent le compartiment générateur de SPZ, l'épithélium séminifère. L'épithélium séminifère est un épithélium unique et extrêmement complexe, les cellules germinales et les cellules de Sertoli subissant des changements structurels et morphologiques majeurs au cours du processus de spermatogénèse. L'interstitium testiculaire contient les cellules de Leydig actives sur le plan stéroïdogène en tant que deuxième type de cellule somatique spécifique du testicule. Il est également peuplé de nombreux autres types de cellules, notamment les fibroblastes, les cellules immunitaires et les vaisseaux sanguins (Schlatt *et al.* 2014).



**Figure 05** : Vue anatomique schématique du testicule (Matumo *et al.* 2021).

Les spermatides matures sont libérées de l'épithélium séminifère dans la lumière du tube séminifère et traversent le système de conduits excréteurs, connu sous le nom de rete testis,

jusqu'à ce qu'elles pénètrent dans l'épididyme via les conduits efférents. Les testicules sont divisés en plusieurs lobes dont chacun est soutenu par des vaisseaux sanguins via des cloisons fibreuses. Les tubes séminifères sont attachés à un rete testis intra-testiculaire central qui s'étend dans le segment initial en tant que partie externe du rete testis (Schlatt *et al.* 2014).

### ***II.1.2. Les constituants du sperme***

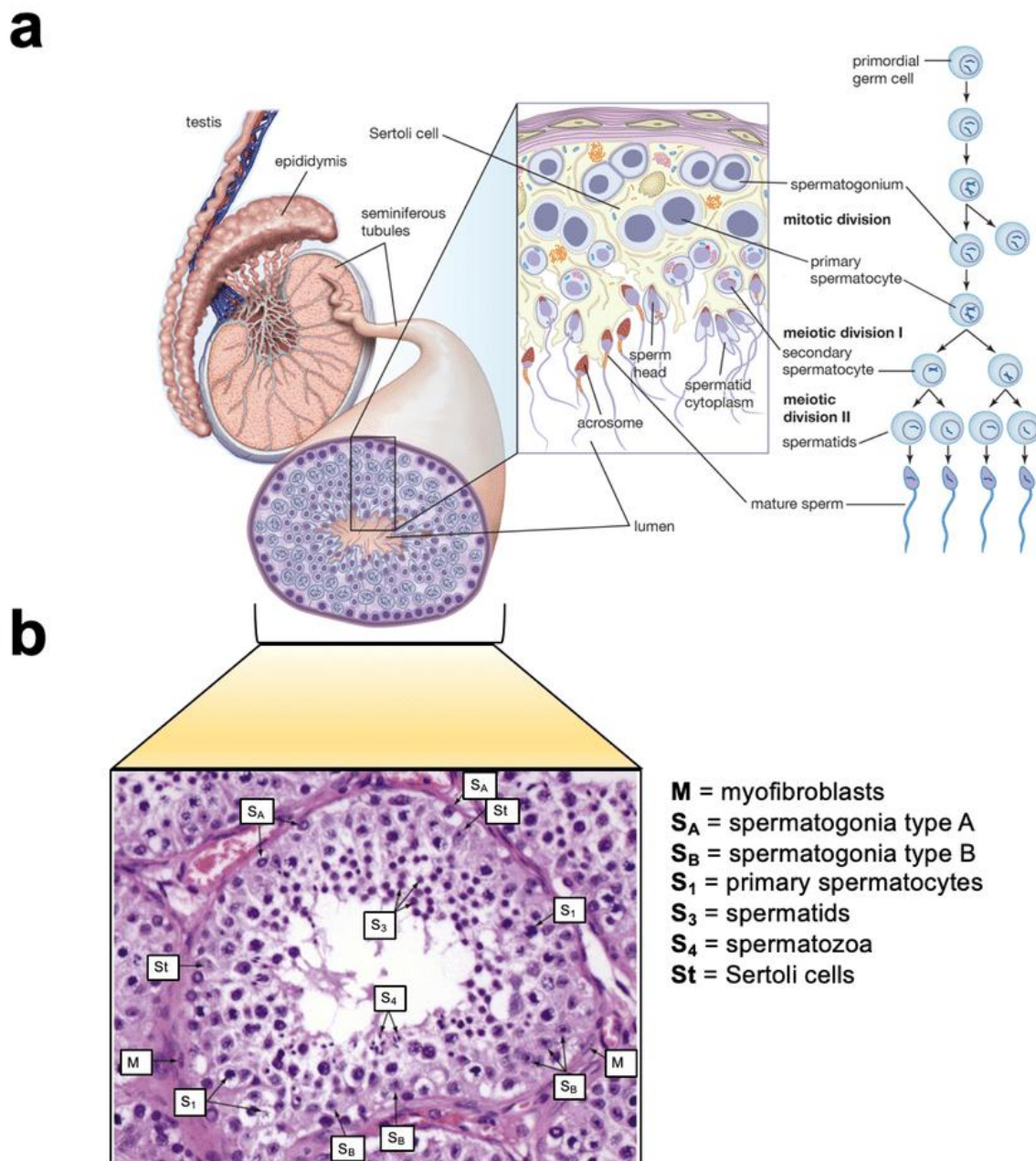
Le sperme est un fluide biologique complexe contenant un très grand nombre de substances secrétées à différents niveaux de l'appareil génital. On estime la production quotidienne de liquide séminal à environ 0,4 mL. Il est constitué de SPZ en suspension dans les sécrétions d'origine testiculaire et épидидymaire, qui se mélangent avec les sécrétions de la prostate, des vésicules séminales et des glandes bulbo urétrales (glandes de Cowper), au moment de l'éjaculation (Rollet 1999, Matumo *et al.* 2021). Le mélange de ces différentes sécrétions est constitué de 5 à 10 % de sécrétion épидидymaire, 20 à 35 % de sécrétion prostatique, 50 à 65 % de sécrétion vésiculaire et environ 5 % de sécrétion de glandes de Cowper (Matumo *et al.* 2021).

### ***II.1.3. La spermatogenèse et le spermatozoïde***

La spermatogenèse est le processus de différenciation cellulaire qui implique la différenciation des cellules souches spermatogonies en spermatocytes via la division cellulaire mitotique. La production de spermatides haploïdes se génère à partir des spermatocytes primaires tétraploïdes via la division cellulaire méiotique. Les spermatides donnent ensuite naissance à des SPZ (gamète male mature) dans la phase finale de la spermatogenèse, appelée spermio-genèse (Nishimura *et al.* 2017). La spermatogenèse s'effectue dans l'épithélium tapissant les tubes séminifères du testicule tout au long de la vie génitale de l'homme à partir de la puberté jusqu'à un âge très avancé. Elle se déroule en 3 phases : la multiplication, la maturation et la différenciation (Esteves *et al.* 2015).

#### ***II.1.3.1. Les étapes de la spermatogenèse***

**A) La phase de multiplication :** Trois types de spermatogonies se trouvent dans le compartiment basal : (1) type A dark (considérées comme des cellules souches testiculaires), (2) type A pâle (réplication par mitose) et (3) type B (le type cellulaire qui progressera en méiose). La méiose sera initiée après la prolifération mitotique des spermatogonies par synthèse de l'ADN qui effectue une réplication de chaque chromosome pour former deux chromatides (**figure 06**) (Esteves *et al.* 2015).



**Figure 06 :** Anatomie des tubules séminifères adultes sains. **a)** La spermatogenèse a lieu dans les tubes séminifères des testicules adultes. Le grossissement d'un coin de tubule séminifère met en évidence divers types de cellules créées lors de la différenciation des cellules germinales primordiales en spermatozoïdes matures. **b)** L'histologie d'une coupe transversale d'un tube séminifère révèle l'organisation spatiale du développement des spermatozoïdes (Schilit 2019).

**B) La phase de maturation :** L'entrée des spermatogonies de type B dans la prophase de la première méiose est représentée par la conversion de ces cellules en spermatocytes primaires ( $2n$ ) qui se divisent pour former des spermatocytes secondaires ( $2n$ ). Ces derniers, après une durée de vie très courte (presque de 6 h) chez l'homme, entament une méiose secondaire pour former des spermatides ronds ( $1n$ ) (de Kretser *et al.* 1998, Esteves *et al.* 2015).

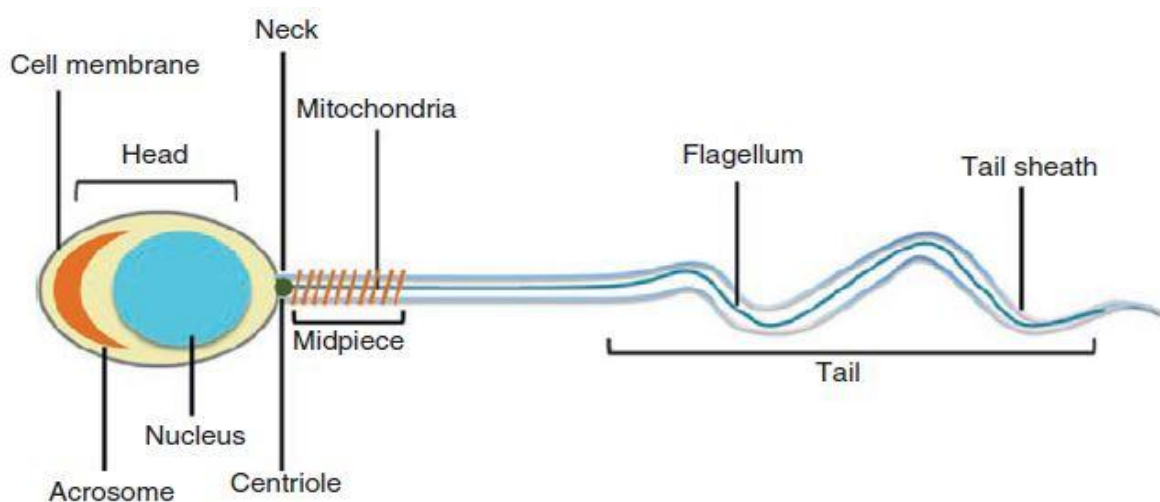
**C) La phase de différenciation ou la spermiogenèse :** Cette étape a lieu dans les tubes séminifères, n'implique aucune division cellulaire et représente une série complexe de modifications cytologiques conduisant à la transformation des spermatides rondes en SPZ. Une fois formés, les SPZ sont libérés dans la lumière tubulaire (spermiation) (Esteves *et al.* 2015).

### II.1.3.2. La régulation de la spermatogenèse

La spermatogenèse a une durée fixe pour chacune des espèces mais variable d'une espèce à l'autre (74 jours dans l'espèce humaine, 35 jours chez la souris). La régulation de la spermatogenèse dépasse le simple contrôle endocrinien exercé par l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (gonadotropin-releasing hormone « Gn-RH », luteinizing hormone « LH » et follicle-stimulating hormone « FSH ») et implique un système de régulation locale qui module les effets du système endocrinien (Rives *et al.* 2012).

### II.1.3.3. La structure du spermatozoïde

Un SPZ morphologiquement normal mesure environ 45 à 50  $\mu\text{m}$  de long et se compose d'une tête et d'une queue (**figure 07**). La tête de forme ovale mesure entre 4,0 et 5,5  $\mu\text{m}$  de longueur et 2,5–3,5  $\mu\text{m}$  de largeur. Elle contient un noyau composé du matériel génétique paternel chromosomique, une région acrosomique bien définie en forme de capuchon des deux tiers antérieurs de la tête et un acrosome qui est représenté par le complexe de Golgi dont il joue un rôle primordial dans la fécondation (Esteves *et al.* 2015).



**Figure 07 :** Représentation schématique d'un spermatozoïde humain mature (Mohanty *et al.* 2017).

La queue du SPZ mesure 40 à 50  $\mu\text{m}$  de long et entre 0,4  $\mu\text{m}$  et 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre est divisée en pièce médiane, pièce principale et pièce finale. La pièce médiane soutenant la tête

exactement à la position centrale est constituée de mitochondries étroitement emballées entourées d'une gaine. Les mitochondries de la pièce médiane fournissent de l'énergie sous forme d'adénosine-triphosphate (ATP) pour le mouvement de la queue. La pièce principale est la partie la plus longue de la queue et comprend la majeure partie de la machinerie propulsive. La queue normale a une pièce finale bien défini, sans enroulement ni flexion anormale (Esteves *et al.* 2015).

#### *II.1.3.4. La composition membranaire du spermatozoïde*

Tous les SPZ des mammifères sont entourés d'une membrane plasmique limitante qui médie de nombreux événements précoces au cours de la fécondation. La membrane est dérivée à l'origine des spermatogonies et des spermatocytes du testicule mais elle subit des modifications au cours de la spermiogenèse, de la maturation épидidymaire et de la capacitation. Elle se caractérise par une proportion inhabituellement élevée des AGPI qui lui confèrent des caractéristiques physiques particulières et la compartimentation de bon nombre de ses composants protéiques et lipidiques en domaines discrets sur la tête et la queue (Jones 1998).

La composition lipidique de la membrane plasmique du sperme est relativement différente de celle des cellules somatiques. Les premières analyses de ces lipides développées à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle dans le sperme des mammifères et des oiseaux ont montré la présence d'acides gras neutres, de phospholipides et de glycolipides. Une analyse plus approfondie a montré que les glycérophospholipides sont la fraction la plus représentative de la membrane du sperme et, parmi eux, la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine sont prédominantes, sans différences significatives entre les espèces (Tapia *et al.* 2012). Les analyses du profil des acides gras des phospholipides membranaires et du plasmalogène des SPZ humains ont mis en évidence des niveaux significatifs d'acides polyinsaturés à savoir : acide  $\alpha$ -linoléique (C18:3 n-3), acide linoléique (C18:2 n-6) et acide oléique (C18:1 n-9) qui sont les acides gras parents des différentes familles d'acides gras polyinsaturés (AGPI) (Lenzi *et al.* 1996).

## **II.2. L'infertilité masculine**

### *II.2.1. Définition de l'infertilité*

L'infertilité du couple se définit par l'absence de conception après deux ans de rapports sexuels non protégés. Elle concerne 15 % des couples et le partenaire masculin est responsable de cette infertilité dans environ 50 % des cas. Si l'infertilité masculine est due à

un défaut de la spermatogenèse, elle est d'origine sécrétoire ; si elle est la conséquence d'une anomalie du transport des SPZ dans la filière génitale, elle est d'origine excrétoire (Lafont *et al.* 2010).

### ***II.2.2. Classification de l'infertilité masculine***

L'infertilité masculine est principalement classée en azoospermie et infertilité coïtale :

#### ***II.2.2.1. Azoospermie***

L'azoospermie est l'absence totale du sperme dans l'éjaculat. Elle est reconnue chez 15 % d'hommes infertiles et est classée en infertilité obstructive et infertilité non obstructive.

**A) Infertilité obstructive :** Dans ce cas, l'éjaculat est dépourvu de SPZ avec une spermatogenèse normale. Environ 40 % des cas d'azoospermie souffrent d'infertilité obstructive. Elle est caractérisée par un système endocrinien et exocrine normal ainsi qu'une spermatogenèse testiculaire normale. Cependant, il existe une obstruction dans le tractus génital. Il peut également se produire dans n'importe quelle partie entre les canaux éjaculateurs et le rete testis.

**B) Infertilité non obstructive :** Environ 60 % des patients atteints d'azoospermie souffrent de l'infertilité non obstructive qui se caractérise par une spermatogenèse anormale. Elle résulte soit d'une insuffisance testiculaire primaire ou secondaire, soit d'une insuffisance testiculaire partielle ou vague (Naz *et al.* 2017).

#### ***II.2.2.2. Infertilité coïtale***

L'infertilité coïtale se caractérise par un tractus génital normal et une production normale de SPZ. Pourtant, la maladie est secondaire au dysfonctionnement sexuel du patient, qui affecte l'éjaculation (Naz *et al.* 2017).

### ***II.2.3. Le bilan de l'infertilité masculine***

Les trois aspects suivants de la fertilité masculine doivent être pris en compte dans les stratégies de gestion :

- L'anamnèse peut identifier les causes de l'infertilité et détecter la présence de facteurs réversibles (médicaments, tabagisme, maladies endocriniennes).
- L'examen clinique peut détecter la présence d'organes génitaux anormaux (hypospadias, testicules atrophiques et varicocèles).
- L'analyse du sperme, les tests endocriniens et les tests d'anticorps spermatiques sont utiles pour identifier la cause de l'infertilité masculine. Le niveau de FSH est un indicateur

de la production de sperme, tandis que les niveaux de testostérone et de LH indiquent un dérèglement des cellules de Leydig (Iammarrone *et al.* 2003).

Le **tableau 02** illustre l'évaluation clinique de l'infertilité masculine.

**Tableau 02** : Évaluation clinique de l'infertilité masculine (Iammarrone *et al.* 2003).

Anamnèse	Examen	Investigation
-Durée de l'infertilité	-Taille testiculaire (4,0–5,5 cm de long)	-Analyse du sperme
-Conceptions antérieures	-Identification des canaux déférents au niveau du col du scrotum	-Tests endocriniens : FSH, LH, testostérone
-Rapports sexuels	-Identification de l'épididyme derrière le testicule	-Tests d'anticorps spermatiques : MAR, IBT
-Maladie générale		
-Alcool, tabac	-Identification de la varicocèle	

### II.2.3.1. L'analyse du sperme

L'analyse du sperme ou spermogramme représente le test initial pour évaluer l'infertilité masculine. Elle comprend l'examen de 8 paramètres des SPZ et du liquide séminal décrits dans le **tableau 03** (Iammarrone *et al.* 2003).

**Tableau 03** : Valeurs normales du spermogramme selon l'Organisation Mondial de la Santé (Young 2016).

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

### II.2.3.2. *Le spermocytogramme*

L'analyse morphologique du sperme ou spermocytogramme peut être réalisée par des techniques d'imagerie différentes. De ce fait, les critères d'interprétation adoptés pour définir un SPZ morphologiquement normal seront variables. L'observation en microscopie optique est la méthode la plus utilisée en routine. Elle s'effectue à partir de préparations fixées et colorées examinées en lumière transmise au grossissement final 1000 × avec des colorations différentes comme la coloration de Papanicolaou. Ensuite, les SPZ seront classés selon leur morphologie : normal ou anormal (Saïdi *et al.* 2008).

## II.3. L'étiologie de l'infertilité masculine

Les étiologies de l'infertilité chez l'homme sont classées en fonction de leurs origines centrales et périphériques. Ces dernières peuvent être sécrétoires ou excrétoires (Matumo *et al.* 2021). Ainsi, ces infertilités masculines peuvent être expliquées par 3 principaux mécanismes dont la fréquence est inégale :

**A) Infertilités masculines par anomalie pré-testiculaire :** Tout déficit profond en gonadotrophines hypophysaires, quelle que soit la cause, est à la fois responsable d'un hypogonadisme et d'une infertilité par interruption de la production testiculaire de SPZ (Griswold 2016).

**B) Infertilités masculines par anomalie testiculaire :** Des maladies primitivement testiculaires altèrent le déroulement de la spermatogenèse. Celle-ci 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. Elle peut être aussi affectée considérablement et directement par des agressions physiques, chimiques et infectieuses (Krausz 2011, Ma *et al.* 2019, Matumo *et al.* 2021).

**C) Infertilités masculines par anomalie post-testiculaire :** Des affections ou lésions empêchant l'évacuation des SPZ en dehors du testicule. Le cheminement des SPZ (des tubes séminifères après spermiation jusqu'aux canaux éjaculateurs après mélange avec le plasma séminal au moment de l'éjaculation) peut être le siège d'obstacles (Matumo *et al.* 2021).

## II.4. Les effets des anticancéreux sur la fonction des gonades masculins

Bien que les médicaments anticancéreux soient plus efficaces dans le traitement de cancer, ils possèdent tous des effets indésirables dus à une cytotoxicité délétère contre les cellules et les tissus normaux dans le processus de chimiothérapie. Le système reproducteur est l'un des organes vulnérables à la chimiothérapie. Le processus de cette dernière peut



entraîner une altération de la fertilité, une modification de la structure des organes, des hormones sexuelles, de la fonction et de la qualité de vie (Haghi-Aminjan *et al.* 2018).

L'hypogonadisme endocrinien et exocrinien sont deux effets indésirables du traitement d'un cancer de testicule qui peut causer des problèmes de fertilité, leur degré étant lié à l'intensité du traitement. Le dysfonctionnement endocrinien testiculaire comprend une production insuffisante de testostérone et/ou une augmentation compensatoire des taux de LH, tandis que le dysfonctionnement exocrine se traduit par une spermatogenèse inadéquate, comme en témoignent des taux accrus de FSH (Sprauten *et al.* 2014).

Plusieurs médicaments, en particulier les agents alkylants (cyclophosphamide, chlorambucil, busulfan, dérivés de platine, ...) à forte dose se sont révélés gonadotoxiques. Les effets délétères de la chimiothérapie sur la production de SPZ sont bien connus, entraînant un arrêt de la spermatogenèse qui se traduit par une azoospermie ou une oligospermie sévère transitoires ou parfois définitives (**tableau 04**) (Bujan *et al.* 2002, Qu *et al.* 2019).

**Tableau 04 :** Risques des principaux anticancéreux sur la fertilité masculine (Delessard *et al.* 2020).

Agents (dose cumulée pour effet)	Classe de médicaments anticancéreux	Risque sur la fertilité après exposition
Cyclophosphamide (19 g/m <sup>2</sup> ) Cisplatine (500 mg/m <sup>2</sup> )	Agent alkylant	Élevé (Azoospermie prolongée)
Ifosfamide (42 g/m <sup>2</sup> ) Doxorubicine (770mg/m <sup>2</sup> )	Agent alkylant Intercalation d'ADN	Modéré (Probabilité d'azoospermie, mais toujours administré avec d'autres agents stérilisants)
Carboplatine (2 g/m <sup>2</sup> ) Doxorubicine (770 mg/m <sup>2</sup> ) Vinblastine (50 g/m <sup>2</sup> )	Agent alkylant Intercalation d'ADN Poison du fuseau	Bas (Réduction temporaire du nombre de SPZ = oligospermie)

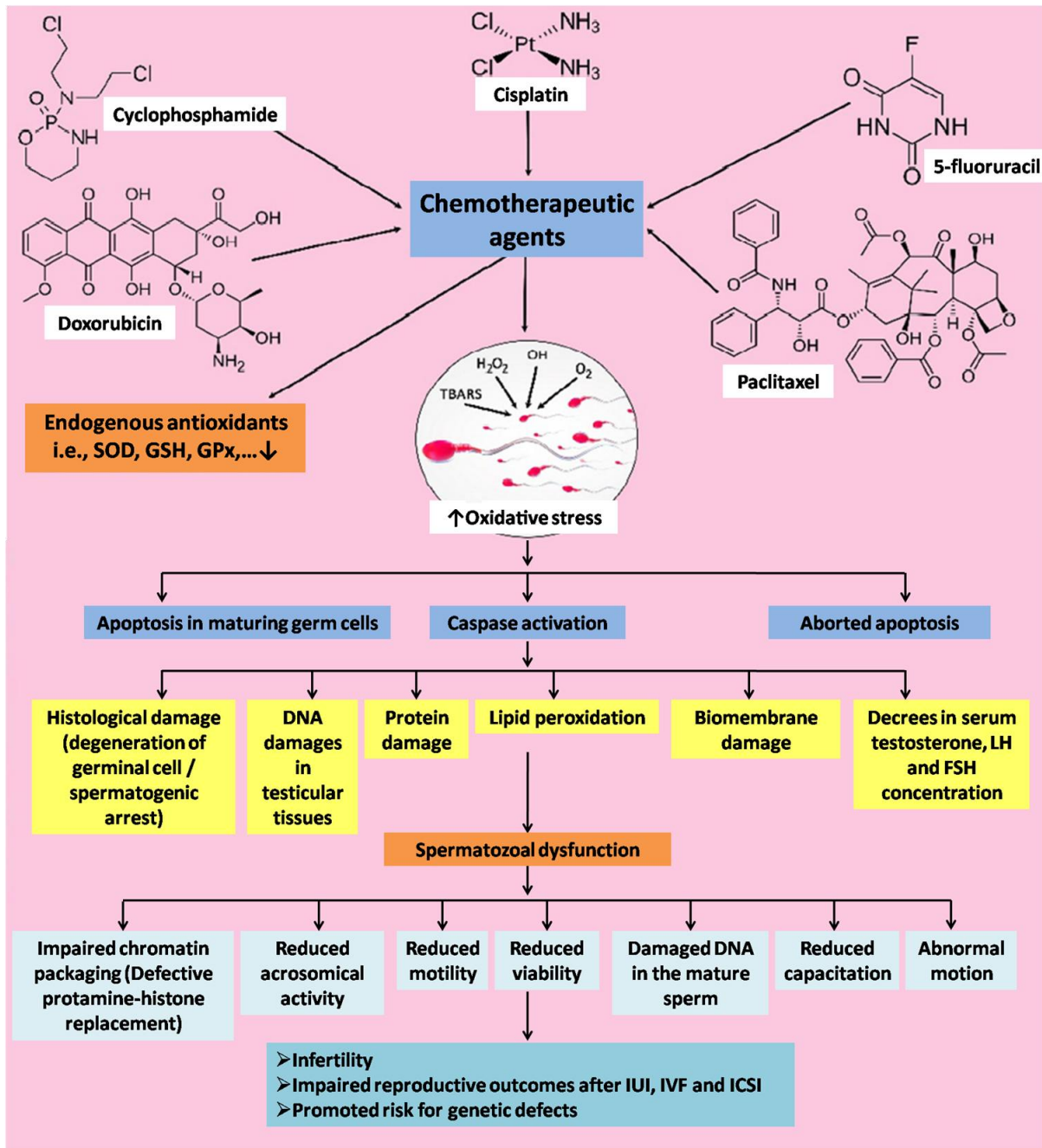
Les effets toxiques des agents de chimiothérapie sur les gonades dépendent de nombreux facteurs, notamment les paramètres primaires du sperme, la voie d'administration du médicament, le type et la dose d'anticancéreux et la phase de spermatogenèse au moment de l'administration du médicament (Ghafouri-Fard *et al.* 2021). Les mutations survenant au début des spermatogonies des cellules souches causent des dommages permanents à la spermatogenèse par rapport aux mutations des spermatogonies à un stade ultérieur, qui entraînent une perturbation spermatogène transitoire. De nombreux médicaments chimiothérapeutiques traversent la barrière hémato-testiculaire et endommagent les cellules germinales directement ou en provoquant une hyalinisation et une fibrose du tissu interstitiel testiculaire (Vakalopoulos *et al.* 2015).

Les spermatozoïdes sont également sensibles à l'effet cytogénotoxique (c'est-à-dire le SO, les dommages de l'ADN, l'apoptose) des composés chimiothérapeutiques (**tableau 05**). De nombreux composés chimiothérapeutiques induisent une augmentation du SO dans les tissus testiculaires associée à une régulation négative des enzymes antioxydantes, qui sont nécessaires pour prévenir la formation excessive des ERO (Delessard *et al.* 2020).

**Tableau 05** : Effets de l'exposition à la chimiothérapie sur la fertilité masculine chez l'homme (Delessard *et al.* 2020).

Cellule somatique	Spermatogonies / spermatocytes	Spermatozoïdes	Progéniture
<b>Exposition <i>in vivo</i></b>			
-Dommages aux cellules de Sertoli (↑FSH, ↓taux d'inhibine) -Altération des cellules de Leydig (↑niveau de testostérone normal et LH)	/	-Mauvaise qualité du sperme -↑Fragmentation et réticulation de l'ADN -Compactage anormal de la chromatine -Interruption de la méthylation de l'ADN -↑Aneuploïdie	-↓Taux de natalité -Pas de risque accru d'anomalies congénitales
<b>Exposition <i>in vitro</i></b>			
/	/	-↓Mobilité des spermatozoïdes	/

Les agents chimiothérapeutiques tels que le CDDP, la doxorubicine, le paclitaxel, le 5-fluorouracile, ainsi que le cyclophosphamide pourraient jouer un rôle efficace dans la réduction de l'expression des antioxydants endogènes et augmente les niveaux des ERO dans les testicules. Ces facteurs causent des dommages à l'ADN du sperme pendant la spermiation ou lors de son transit via l'appareil reproducteur masculin et entraînent éventuellement un dysfonctionnement du sperme induit par le SO et l'infertilité masculine. Les dommages à l'ADN entraînent une apoptose abortive, des anomalies ou des mutations dans la maturation des SPZ et augmentent le risque de défauts génétiques (**figure 08**) (Ghafouri-Fard *et al.* 2021).



**Figure 08 :** Explication schématique de l'implication du SO chimio-induit sur la reproduction et la fertilité masculine (Ghafouri-Fard *et al.* 2021).

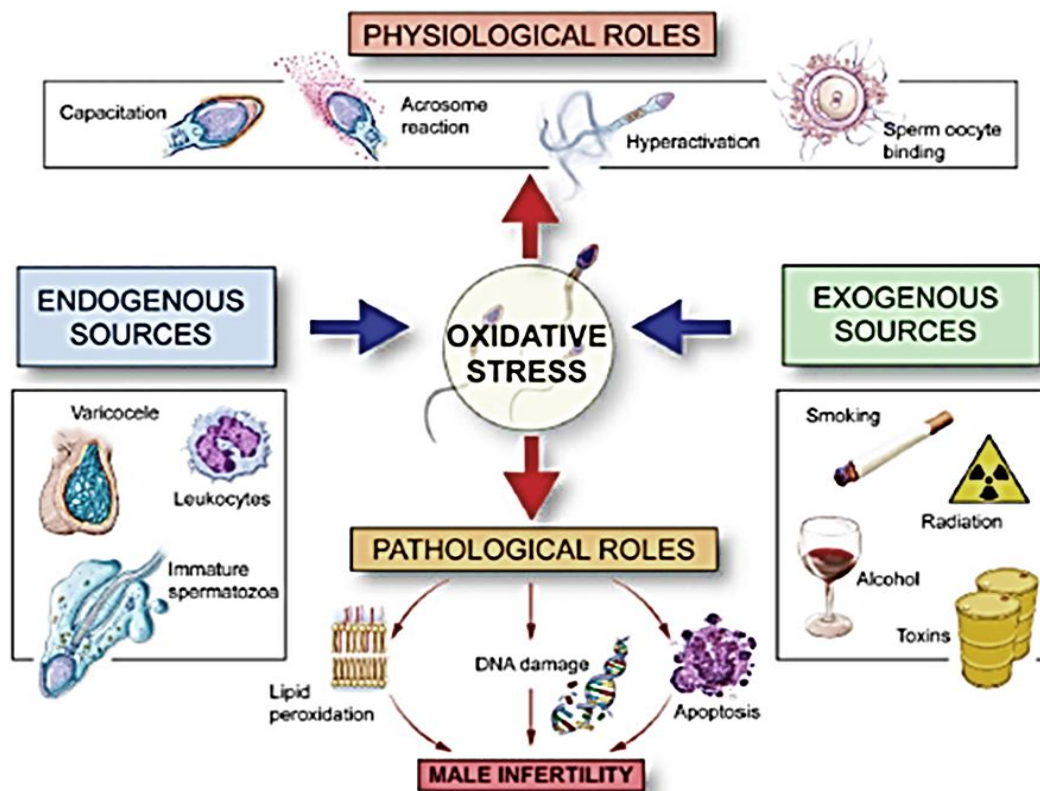
### III. La relation entre le stress oxydant, le système antioxydant et le spermatozoïde

#### III.1. Le stress oxydant

##### III.1.1. Le stress oxydant et ses sources

Le stress oxydant (SO) est défini comme un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité antioxydante disponible, entraînant un paradoxe redox (Alahmar 2019). En chimie, l'oxydation est la perte d'un électron, tandis que la réduction est le gain d'un électron. Cette nomenclature reflète la tendance de l'oxygène, un atome hautement électronégatif, à arracher partiellement ou totalement un électron à d'autres molécules. Les ERO sont des atomes ou des molécules à un seul électron non apparié, comprenant, entre autres, le superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ) et le radical peroxyde lipidique ( $LOO^{\bullet}$ ). Bien que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ne soit pas un radical libre, c'est un précurseur de  $HO^{\bullet}$  (Pena *et al.* 2019). Le métabolisme aérobie dans les cellules spermatiques crée des ERO comme sous-produit. Le processus de phosphorylation oxydative mitochondriale utilise le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) comme donneur d'électrons et  $O_2$  comme accepteur d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons, couplant à la fois les réactions de réduction et d'oxydation avec la synthèse d'ATP. La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH), les leucocytes spermatiques, l'infection sont également parmi les sources intrinsèque de production d'ERO spermatique (Wagner *et al.* 2018).

Des facteurs extrinsèques tels que le tabagisme, la consommation d'alcool et l'exposition aux radiations, aux métaux lourds industriels, aux pesticides et aux polluants ont été associés à une augmentation d'ERO et de l'infertilité masculine (**figure 09**). Les tumeurs malignes sont une autre source extrinsèque importante d'ERO, ainsi que l'exposition aux radiations, la chimiothérapie et les agents anticancéreux qui les accompagnent (Alahmar 2019).



**Figure 09 :** Les étiologies physiologiques et pathologiques de la génération d'espèces réactive à l'oxygène (Agarwal *et al.* 2014).

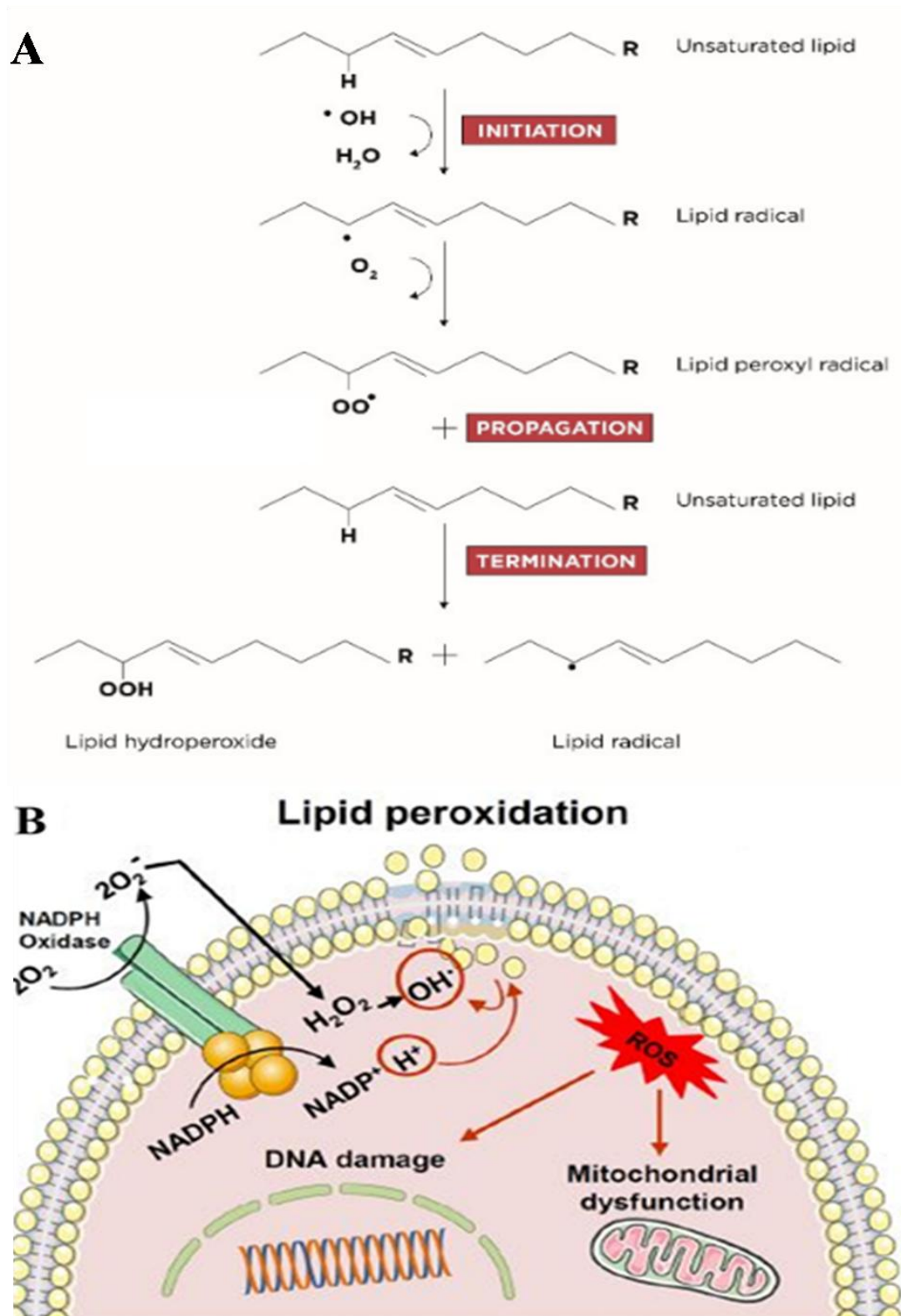
### III.1.2. Les effets du stress oxydant sur la cellule spermatique

Le SPZ humain est une cellule très vulnérable à la présence non contrôlée des ERO. Le déséquilibre de la balance oxydants-antioxydants a des conséquences sur les capacités fonctionnelles des SPZ, essentiellement sur la mobilité, la réaction acrosomique, la fusion avec la membrane ovocytaire et l'intégrité du noyau du SPZ (Feki *et al.* 2003).

#### III.1.2.1. Les effets sur la membrane plasmique du spermatozoïde

Les SPZ sont particulièrement sensibles aux dommages oxydatifs en raison de leur membrane lipidique riche en AGPI qui sont d'excellentes cibles des réactions redox par la nature de leurs doubles liaisons carbone-carbone alternées et se transforment facilement en radicaux lipidiques. La cascade de la peroxydation lipidique (PL) génère des radicaux hydroperoxydes lipidiques supplémentaires qui maintiennent les réactions de la peroxydation et aboutissent à la formation d'aldéhydes électrophiles de faible masse moléculaire (**figure 10**) comme les malondialdéhydes (MDA) qui est induit par le système promoteur de l'ascorbate ferreux (Sharma *et al.* 1996, Bisht *et al.* 2017, Ritchie *et al.* 2021). Ces peroxydes lipidiques s'accumulent dans la membrane, entraînent la diminution de sa fluidité et de sa perméabilité. Sa fonction étant complètement perturbée, la membrane se désorganise. Si les dégâts sont trop

importants, les peroxydes peuvent conduire à la mort de la cellule. Et ils peuvent aussi réagir avec d'autres composés cellulaires et être à l'origine de molécules très toxiques (Ritchie *et al.* 2021).



**Figure 10** : La peroxydation lipidique. A : Les trois étapes de la peroxydation lipidique : initiation, propagation et terminaison. B : Des taux excessifs d'ERO initient la peroxydation lipidique affectant la membrane, l'ADN et les mitochondries du sperme (Barati *et al.* 2020, De Luca *et al.* 2021).

Les SPZ manquent également des outils inhérents à la réparation mitochondriale. Des études *in vitro* montrent qu'il existe une corrélation négative entre les concentrations des MDA, un produit final de la PL, avec la mobilité et la morphologie des SPZ. De plus, il a aussi été démontré que des concentrations significativement plus élevées de MDA chez les mâles oligo- et asthénozoospermiques, renforçant davantage la corrélation négative avec le nombre, la mobilité et la morphologie des SPZ (Ritchie *et al.* 2021).

#### *III.1.2.2. Les effets sur les protéines spermatiques*

Les protéines sont la cible de réactions redox, qui peuvent activer ou inactiver leur fonctionnalité. Selon le type d'ERO, les protéines peuvent être altérées par l'oxydation du thiol, la nitration de la tyrosine, la sulfonation ou la glutathionylation. L'oxydation du thiol est la modification protéique la plus courante qui cible les enzymes glycolytiques et du cycle de Krebs, ce qui entraîne une réduction de l'efficacité de la production d'ATP; cible l' $\alpha$ -tubuline, qui altère la polymérisation des microtubules ; et cible les protamines, qui affectent le remodelage de la chromatine au cours de la spermiogenèse (Ribas-Maynou *et al.* 2020).

#### *III.1.2.3. Les effets sur l'ADN spermatique*

La fragmentation de l'ADN des SPZ est l'autre effet majeur causé directement ou indirectement par le SO. Au contact de l'ADN du sperme, les ERO provoquent des modifications de bases, telles que la 8-OH-guanine et la 8-OH-2'-désoxyguanosine qui, après avoir été excisées par l'enzyme 8-Oxoguanine ADN glycosylase 1, génèrent un site abasique qui donne lieu à une cassure simple brin de l'ADN et en sachant l'incapacité du SPZ à réparer son génome endommagé ; des SPZ avec d'ADN fragmenté sont observés dans l'éjaculat. Le SO peut également favoriser la décondensation nucléaire, augmentant la susceptibilité de l'ADN à être endommagé par les radicaux libres, qui auront ainsi un accès plus facile à l'ensemble du génome du sperme (Ribas-Maynou *et al.* 2020).

#### *III.1.2.4. Les effets sur la mobilité du spermatozoïde*

Il a été démontré que la diminution de la mobilité est due à la PL induite par l'ERO, principalement médiée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réduction de la mobilité des SPZ est proportionnelle à la quantité de PL. Les dommages induits par l'ERO sur l'ADN mitochondrial entraînent une diminution de l'ATP et de la disponibilité de l'énergie, ce qui entrave la mobilité des SPZ. Des études ont montré des niveaux plus élevés d'ERO chez les patients atteints d'oligospermie. Des niveaux élevés d'ERO perturbent les membranes mitochondriales, entraînant l'activation des caspases et finalement l'apoptose. La libération du cytochrome c au cours de la voie

apoptotique augmente encore les niveaux d'ERO, favorisant les dommages et la fragmentation de l'ADN et augmentant potentiellement le cycle apoptotique (Wagner *et al.* 2018).

### III.1.3. Les différents tests pour mesurer les espèces réactives de l'oxygène dans le sperme

Divers tests ont été développés pour détecter les niveaux d'ERO séminales qui peuvent être classés en tests directs et indirects (**tableau 06**). L'asthénozoospermie dans un échantillon de sperme est probablement un marqueur d'ERO. L'hyperviscosité a également été évocatrice d'une augmentation du SO car elle est attribuée à des taux accrus de MDA. L'augmentation des leucocytes ou des cellules rondes, qui est l'une des principales sources d'ERO, peut suggérer des tests supplémentaires pour un stress oxydatif (Alahmar 2019).

**Tableau 06 :** Exemples de tests directs et indirects utilisés pour mesurer l'oxydation (Wagner *et al.* 2018).

Tests	Fonctions	Méthodes de mesures
<b>Tests direct</b>		
Cytométrie en flux	Mesure des ERO	L'incubation avec un colorant émet une fluorescence lorsqu'elle est excitée par une source lumineuse à des longueurs d'onde spécifiques
Réduction du cytochrome c	Mesure des ERO sur la membrane cellulaire	Les radicaux superoxydes réduits en ferricytochrome c sont identifiés
<b>Tests indirect</b>		
Niveau de peroxydation lipidique	Détection de la peroxydation lipidique grâce à l'identification des sous-produits	Les niveaux de MDA mutagène et de sous-produits toxiques de 4-HNE de la peroxydation lipidique sont mesurés à l'aide de dosages d'acide thiobarbiturique et de réactions colorimétriques
Capacité antioxydante totale	Évaluation du statut antioxydant d'un échantillon biologique	L'ajout d'un dosage chimioluminescent amélioré au plasma séminal mesure la suppression de la chimioluminescence et le temps de récupération

## III.2. La protection par les antioxydants

Bien que les ERO soient essentielles pour certains processus de reproduction tels que la capacitation et la réaction acrosomique, leur augmentation ainsi que celle accompagnée par la diminution de la défense antioxydante entraînent un déséquilibre redox. Les SPZ sont très sensibles aux effets délétères des ERO en raison des grandes quantités d'AGPI dans leurs membranes cellulaires ce qui favorise la PL par les ERO aboutissant à une charge oxydative



intracellulaire. Cependant, le liquide séminal est doté d'un système antioxydant dirigé vers la protection des SPZ contre les quantités excessive d'ERO (Alahmar 2019, Haq *et al.* 2020).

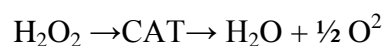
### ***III.2.1. La définition et la classification des antioxydants***

Les antioxydants sont des agents réducteurs qui réagissent avec et tamponnent les ERO et sont considérés comme une forme de défense contre le SO. Ils sont classés en agents enzymatiques ou non enzymatiques, les agents non enzymatiques étant subdivisés en ceux produits de manière endogène ou ceux consommés par le biais d'aliments ou de suppléments (Wagner *et al.* 2018).

#### *III.2.1.1. Les antioxydants enzymatiques*

Le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) forment le principal système antioxydant du sperme. Ces métalloenzymes sont présentes à la fois dans l'espace intracellulaire et extracellulaire (Alahmar 2019).

Parmi les antioxydants biologiques bien connus, le SOD et ses deux isoenzymes et la CAT ont un rôle important. Le SOD dismutase spontanément l'anion ( $O^{\cdot-}$ ) pour former  $O^2$  et  $H_2O_2$ , tandis que la CAT convertit  $H_2O_2$  en  $O^2$  et  $H_2O$  (Choudhary *et al.* 2010).

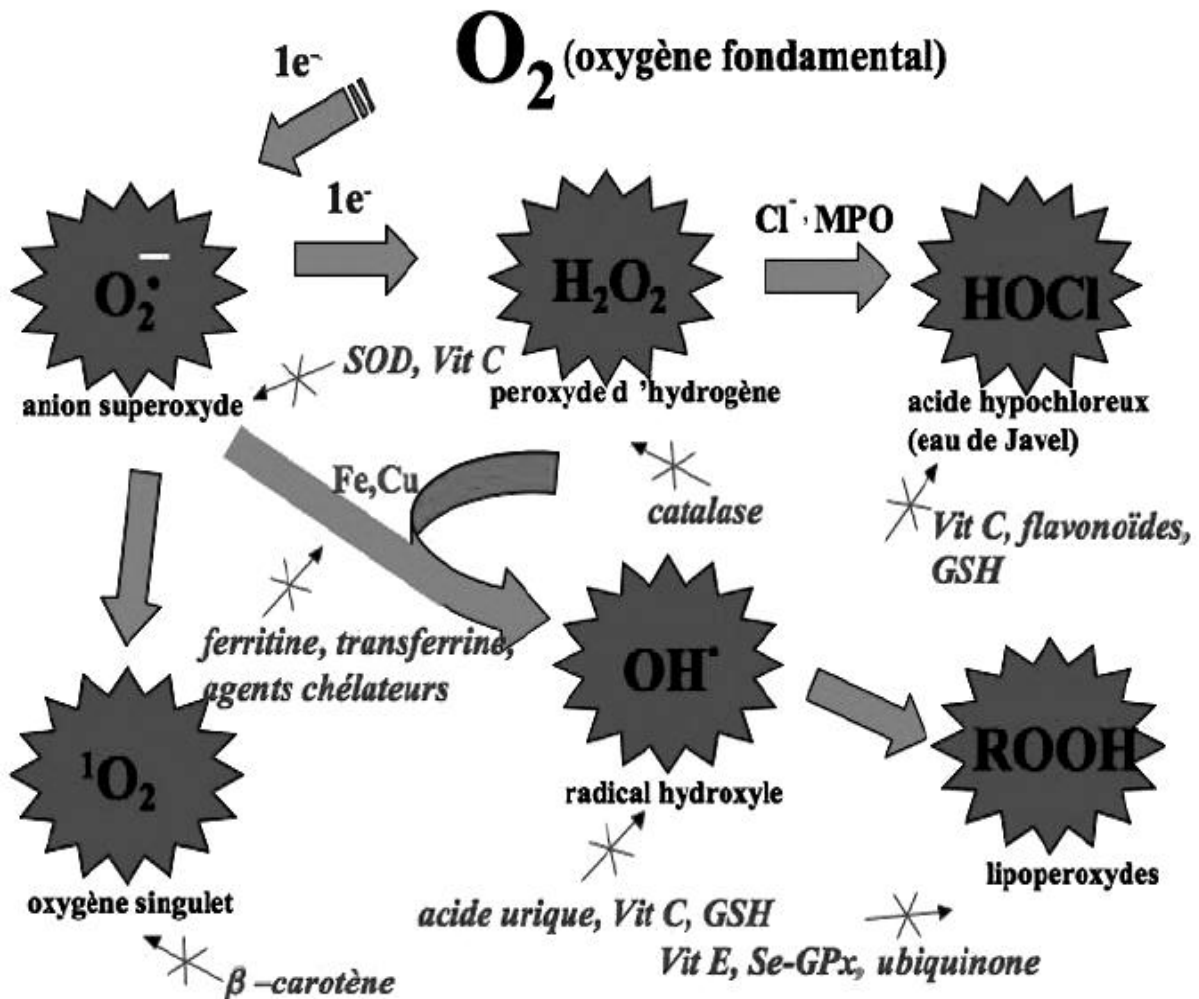


Le SOD élimine les anions superoxydes extracellulaires et intracellulaires et empêche la PL de la membrane plasmique. Elle prévient également l'hyper activation et la capacitation prématurées induites par les radicaux superoxydes avant l'éjaculation. La CAT détoxifie à la fois le  $H_2O_2$  intracellulaire et extracellulaire en eau et en  $O^2$ . De plus, la CAT active la capacitation des SPZ induite par le NO, qui est un mécanisme complexe impliquant  $H_2O_2$  (Choudhary *et al.* 2010).

Le système GPx/réductase forme une excellente protection contre la PL de la membrane plasmique des SPZ. La glutathion peroxydase (Se-GSH-Px) avec le glutathion (GSH) comme donneur d'électrons élimine les radicaux peroxydes ( $ROO\cdot$ ) de divers peroxydes, y compris  $H_2O_2$ . La glutathion réductase (GSH-Red) régénère ensuite le GSH réduit à partir du GSSG, comme indiqué dans l'équation suivante :



Il élimine les peroxydes lipidiques, arrêtant ainsi la réaction en chaîne progressive de la PL. Il récupère également le  $H_2O_2$  qui est responsable de l'initiation de la peroxydation des lipides, La GSH-Red stimule la réduction du disulfure de GSH en glutathion réduit (**figure 11**). Cela garantit un apport constant du substrat réducteur NADPH à la GPx. Le G-6-PDH est nécessaire à la conversion du  $NADP^+$  en sa forme réduite NADPH (Choudhary *et al.* 2010).



**Figure 11** : Aperçu des différentes espèces réactives de l'oxygène et des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng *et al.* 2007).

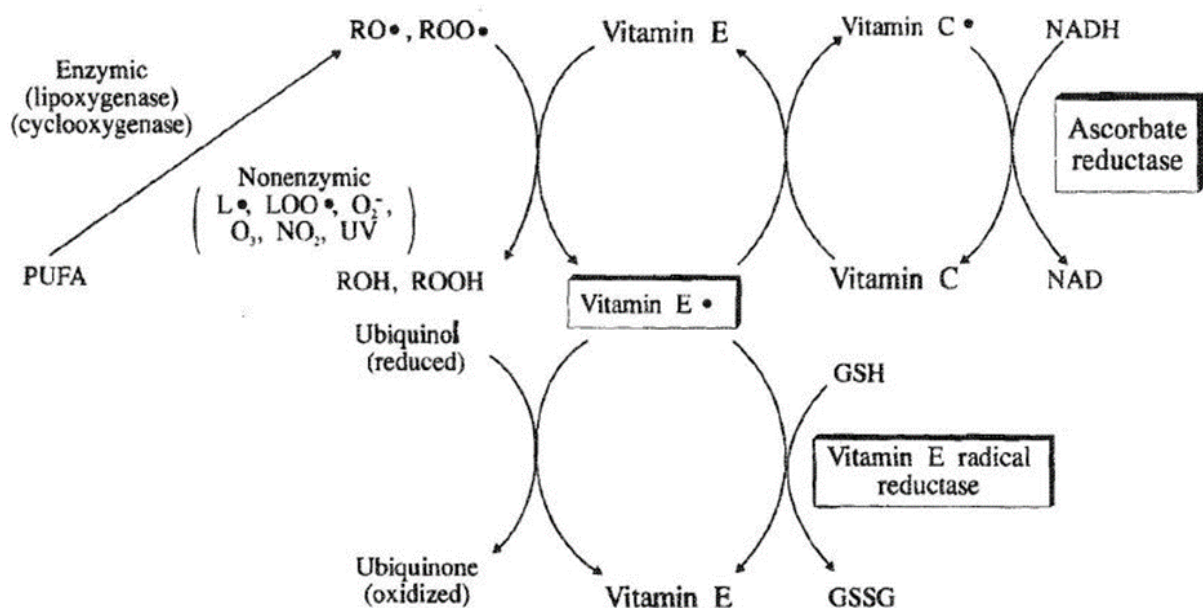
### III.2.1.2. Les antioxydants non enzymatiques

De nombreux antioxydants non enzymatiques sont présents dans le sperme, notamment les complexes de vitamines A, E, C et B, le GSH, la coenzyme Q10, la carnitine et des minéraux tels que le zinc, le cuivre, le sélénium et le chrome (**tableau 07**). Le GSH est un thiol tripeptidique avec un large éventail de fonctions biologiques, y compris la préservation du statut redox intracellulaire et la détoxification des composés exogènes et endogènes. Il

possède un pouvoir réducteur inné qui protège les cellules contre le SO, notamment grâce à son groupement sulfhydrile (SH) (Alahmar 2019).

Ces antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle : les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles. Ils seront particulièrement efficaces sur les ERO présents dans chaque type de milieu, respectivement.

La VE ou  $\alpha$ -tocophérol est une molécule liposoluble présente dans les amandes, les avocats, les épinards et les patates douces. C'est un composé amphiphile capable de s'insérer dans les membranes cellulaires comme globule rouge, gamètes...etc. Elle possède de puissantes propriétés antioxydantes, en neutralisant les ERO et en inhibant les dommages causés par ces derniers aux membranes cellulaires ; entraînant la prévention de la PL et l'amélioration d'autres antioxydants (**figure 12**) (Alahmar 2019).



**Figure 12:** Les voies de l'oxydation et de la régénération de la vitamine E (Chan 1993).

La VC, également connue sous le nom d'acide ascorbique est l'un des antioxydants hydrosolubles les plus abondants dans les tissus des mammifères, agissant comme cofacteur réducteur dans plusieurs réactions enzymatiques et que l'on trouve dans les fruits citriques et les baies fraîches. Elle prévient la PL, recycle la VE (**figure 12**) ; contribuant au maintien de l'état redox de cette dernière au sein des membranes biologiques, protège contre les dommages à l'ADN induits par le radical  $H_2O_2$  et empêche l'agglutination des SPZ (Choudhary *et al.* 2010, Alahmar 2019). Il a été démontré qu'un faible apport en nutriments antioxydants semble

aggraver la qualité du sperme tandis que l'ingestion régulière d'aliments riches en VC améliore les caractéristiques morfo-fonctionnelles du sperme (Amorini *et al.* 2021).

**Tableau 07 :** Les antioxydants, leurs caractéristiques et leurs effets sur les paramètres du sperme (Bisht *et al.* 2017).

Antioxydant	Caractéristiques	Impact sur les paramètres du sperme
Vitamine E	Antioxydant majeur briseur de chaîne dans la membrane plasmique du sperme	Préserve et restaure la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes en supprimant les dommages peroxydatifs lipidiques à la membrane plasmique des spermatozoïdes
Vitamine C	Principal antioxydant hydrophile du plasma séminal, contribue à 65 % de la capacité antioxydante de rupture de chaîne	-Augmente la mobilité des spermatozoïdes de manière dose-dépendante -Des doses élevées peuvent endommager les structures de la chromatine en perturbant les ponts disulfures et en augmentant ainsi la densité cellulaire de la coloration de 17,5 à 21,5 % après une dose de 3 mM

### III.2.2. La thérapie antioxydante

Les systèmes de piégeage des antioxydants jouent un rôle important dans l'inactivation des ERO et diverses thérapies antioxydantes et combinaisons de régimes, telles que la VC, la VE, le sélénium, le zinc et le GSH sont utilisées depuis longtemps comme traitements de l'infertilité masculine (Naz *et al.* 2017). La justification de la thérapie antioxydante orale est que le SO séminal est dû à une production accrue d'ERO et/ou à une diminution des niveaux d'antioxydants séminaux. Les différents antioxydants oraux disponibles appartiennent à la catégorie des antioxydants exogènes et comprennent la VC, la VE, la coenzyme Q10, la N-acétylcystéine, les carnitines, des oligo-éléments tels que le zinc, le sélénium, et une combinaison de ces antioxydants oraux (Alahmar 2019).

Étant donné que les ERO ont des rôles à la fois physiologiques et pathologiques, un ensemble d'antioxydants maintient un état stable d'ERO dans le plasma séminal. Ces antioxydants compensent la perte d'enzymes cytoplasmiques des SPZ lorsque le cytoplasme est extrudé pendant la spermiogenèse, ce qui, à son tour, diminue les mécanismes de réparation endogènes et les défenses enzymatiques (Choudhary *et al.* 2010). De nombreuses études ont été menées pour évaluer l'efficacité de la supplémentation orale en antioxydants pour le traitement de l'infertilité masculine. La plupart des études ont montré une amélioration d'un ou plusieurs paramètres du liquide séminal, alors que certaines études n'ont rapporté aucun effet positif (Alahmar 2019).

Les déficiences des systèmes antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques sont associées à l'infertilité masculine car l'absence de l'un de ces systèmes conduit à l'accumulation de niveaux excessifs d'ERO, qui endommagent le génome du sperme, le rendant ainsi incapable de féconder l'ovocyte. D'autres antioxydants alimentaires comprennent les vitamines C et E, les caroténoïdes et les flavonoïdes, qui sont des antioxydants briseurs de chaîne qui agissent par clivage de la chaîne de PL et donc en piégeant les radicaux libres (Bisht *et al.* 2017).

L'administration de 100 mg de VE trois fois par jour pendant 6 mois à un groupe de patients asthénozoospermiques avec des partenaires féminines normales a montré une diminution significative de la PL et une augmentation de la mobilité des SPZ et des taux de grossesse (Choudhary *et al.* 2010). Lorsque la VC est administrée à certains patients, elle exprime un résultat dépendant de la dose sur la qualité du sperme. Lorsque 1000 mg de VC sont administrés par voie orale, cela peut améliorer la mobilité des SPZ, tandis qu'une dose élevée de cette vitamine peut endommager les SPZ et diminuer la mobilité des SPZ. L'administration de 200 mg de VC par voie orale avec de la VE et du GSH pendant 2 mois a considérablement réduit les niveaux d'hydroxyle glutathion dans les SPZ et a également entraîné une augmentation du nombre de SPZ (Choudhary *et al.* 2010, Naz *et al.* 2017).

# *Partie Pratique*

## I. Matériel et méthodes

### I.1. Matériel .....

L'objectif de notre travail consiste à étudier l'impact direct des anticancéreux sur le SPZ mature et évaluer en même temps l'effet protecteur des antioxydants (vitamine E et C seul ou combinés) sur la toxicité de ces anticancéreux, à savoir le carboplatine (CBDCA). Ce travail est réalisé au niveau du Laboratoire Associé en Ecosystèmes Marins et Aquacoles de la faculté SNV de l'université A/Mira de Bejaia.

#### I.1.1. Matériel biologique

Les échantillons de sperme ont été prélevés par masturbation dans des récipients stériles après une période d'abstinence sexuelle de 3 à 5 jours par des hommes qui ont demandé une analyse du sperme auprès du laboratoire d'analyses Médicales. Après la liquéfaction de 20 min à température ambiante, chaque aliquot a été examiné pour les paramètres suivants : la concentration, la mobilité et le pH des SPZ conformément aux directives standards récemment mises à jour par l'OMS. Ces échantillons ont été récupérés auprès des laboratoires médicaux de Dr. Lalaoui et Dr. Moualek situés à Bejaia. Ensuite, ils sont transportés à température ambiante jusqu'au laboratoire de l'université. Pour nos expériences, seuls les SPZ frais éjaculés provenant d'individus ayant un volume de sperme  $\geq 1,5$  mL, une concentration de sperme  $\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$  et une mobilité progressive  $\geq 32\%$  ont été utilisés (Rabaca *et al.* 2020, Chemlal *et al.* 2021).

#### I.1.2. Appareillage et produits chimiques utilisés





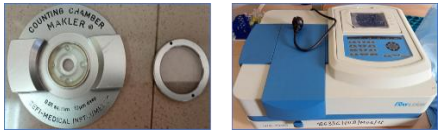
Le **tableau 08** énumère les différents matériels et produits chimiques utilisés ainsi que leur provenance correspondante.

**Tableau 08** : Les produits et le matériel utilisés dans l'expérimentation.

Produit	Firme
Tampon Tris	
Tris (Hydroxyméthyleamino- méthane)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Fructose	
Eau distillé	

À suivre



Suite de tableau 08

	Acide citrique	
	Péniciline G	GECTAPEN
Anticancéreux		
	CBDCA	Mylan 10 mg/mL
Antioxydants	VC et VE	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Produits chimiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hydroxyde de sodium (NaOH)</li> <li>-Acide thiobarbiturique (TBA)</li> <li>-Acide trichloracétique (TCA)</li> <li>- Acide éthylène-diamine tétra acétique (EDTA)</li> </ul>	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Appareillage		
	Thermomètre	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Microscope et système CASA	Nikon eclipse E200, Japan
	Etuve	Ecocell 55 Germany
	Centrifugeuse	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Agitateur électromagnétique	VELP scientifica
	Balance analytique	QIAS
	Vortex	VELP scientifica Europe
	Spectrophotomètre à UV	Rayleigh analytical instrument Co .Ltd
	Bain-marie	SyncMaster SA100
	Chambre de Makler	SefiMedical Instrument,Haifa

À suivre



Suite de tableau 08

Petits matériaux		
	Micropipettes de 100 $\mu$ L et de 1000 $\mu$ L	Accumax
	Eppendorfs et tube en verre	
	Embouts et la seringue de 10 mL	
	Spatule, bécher, fiole, verre de montre	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Lunettes de protection, papier aluminium, étiquettes...	

Le système CASA ou analyse de sperme assistée par ordinateur est un système d'imagerie électronique pour visualiser le sperme et un logiciel avancé qui permet d'évaluer des dizaines de paramètres spermatiques tels que : la concentration, la mobilité, la vitalité ou encore la morphologie des SPZ mais aussi les paramètres cinétiques (**figure 14**). Il s'agit en effet d'une méthode semi-automatisée puisque l'opérateur doit se déplacer sur la chambre de comptage « Makler » pour obtenir les différents champs. Cette chambre peut contenir un volume de 10  $\mu$ L de sperme qui sera déposé et analysé sous le microscope optique (Lu *et al.* 2010).



**Figure 13** : Photographie de l'analyseur CASA.

Ce système est composé d'un microscope optique à contraste de phase négatif qui permet d'obtenir les têtes des SPZ sous forme d'objets blanc sur un fond noir. Ce microscope à fort grossissement (zoom) équipé d'une caméra permettant la capture et la numérisation des images et de séquences vidéo. Il est équipé aussi d'un système informatique (ordinateur)

munis d'un logiciel permettant le traitement des images et séquences vidéo. Cet équipement permet de fournir des évaluations et des estimations précises sur les paramètres spermatiques dont le manuel de l'OMS 2010 donne leurs définitions comme suit :

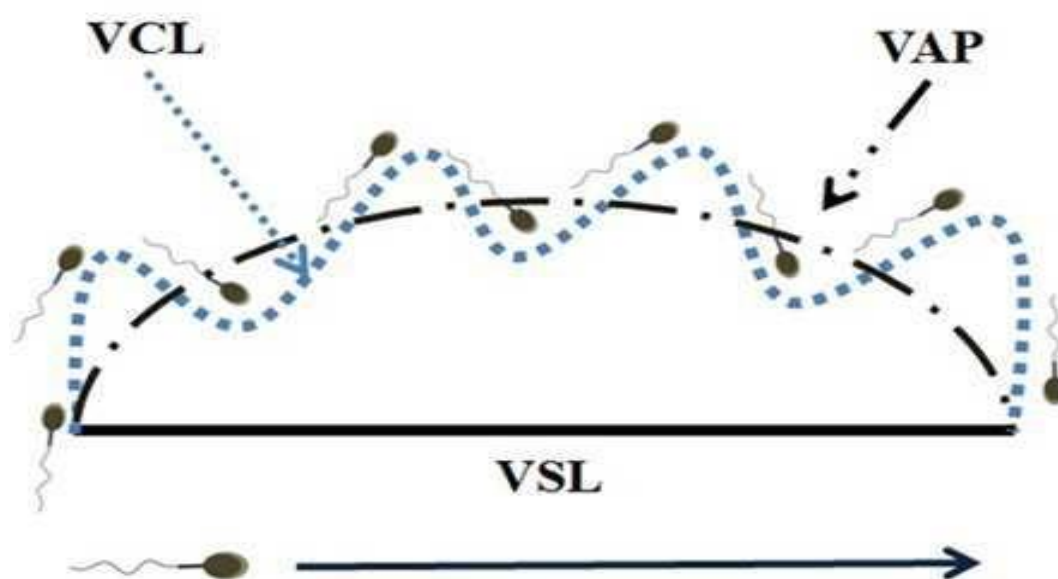
- **VSL (Straight line velocity)** : la vitesse en ligne droite ( $\mu\text{m/s}$ ) correspondant à la trajectoire rectiligne définie à partir de la distance entre la première et la dernière position de la tête.

- **VCL (Curvilinear velocity)** : la vitesse ( $\mu\text{m/s}$ ) calculée selon la trajectoire curvilinéaire (somme des distances entre les différentes positions de la tête sur chaque image).

- **VAP (Average path velocity)** : la vitesse ( $\mu\text{m/s}$ ) selon la trajectoire moyenne.

- **PR (motilité rapide progressive)** : définie comme le pourcentage de SPZ avec VCL  $> 25 \mu\text{m/s}$  et une motilité en ligne droite (Lu *et al.* 2010).

Les instruments CASA ne pouvaient pas faire la différence entre une tête de sperme et des débris, ce qui est considéré comme une source d'erreur. Le système Stromberg-Mika CASA a résolu ce problème en exigeant l'analyse d'un SPZ complet (composé d'une tête et d'une queue) (Mortimer 2000).



**Figure 14** : Certains paramètres cinétiques du sperme mesurés par le système CASA (Baiee *et al.* 2017).

## I.2. Méthodes

### I.2.1. Préparation de la solution TRIS

La solution tampon TRIS a été préparée en dissolvant du TRIS « hydroxyméthylaminométhane », du fructose, de l'acide citrique et de la pénicilline G dans de l'eau distillée (Taouzinet *et al.* 2022).

### ***1.2.2. Préparation et traitement du sperme***

Dans notre protocole, nous avons utilisé le sperme humain comme un modèle cellulaire. Après avoir confirmé que l'échantillon est de bonne qualité (normospermie), il est ensuite introduit dans une étuve à une température de 37°C. Les échantillons de sperme ont été centrifugés pendant 10 min à 2000 g. Le liquide séminal est éliminé soigneusement par pipetage et le culot a été remis en suspension dans le tampon Tris correspondant au même volume que le plasma séminal rejeté.

### ***1.2.3. Préparation de solution d'anticancéreux***

L'anticancéreux utilisé (CBDCA) a été récupéré au niveau du service d'oncologie du CHU de Bejaia. Le CBDCA est préparé dans une solution isotonique à une concentration désirée à tester. Cette concentration qui est de 5 mg/mL a été choisie tout en respectant la norme des doses administrées en clinique humaine .

### ***1.2.4. Préparation des solutions des antioxydants***

#### ***1.2.4.1. Préparation de la solution de la vitamine C***

1 mg de poudre lyophilisée de la VC était dissous dans 10 mL de solution de TRIS pour obtenir une concentration de 0,1 mg/mL.

#### ***1.2.4.2. Préparation de la solution de la vitamine E***

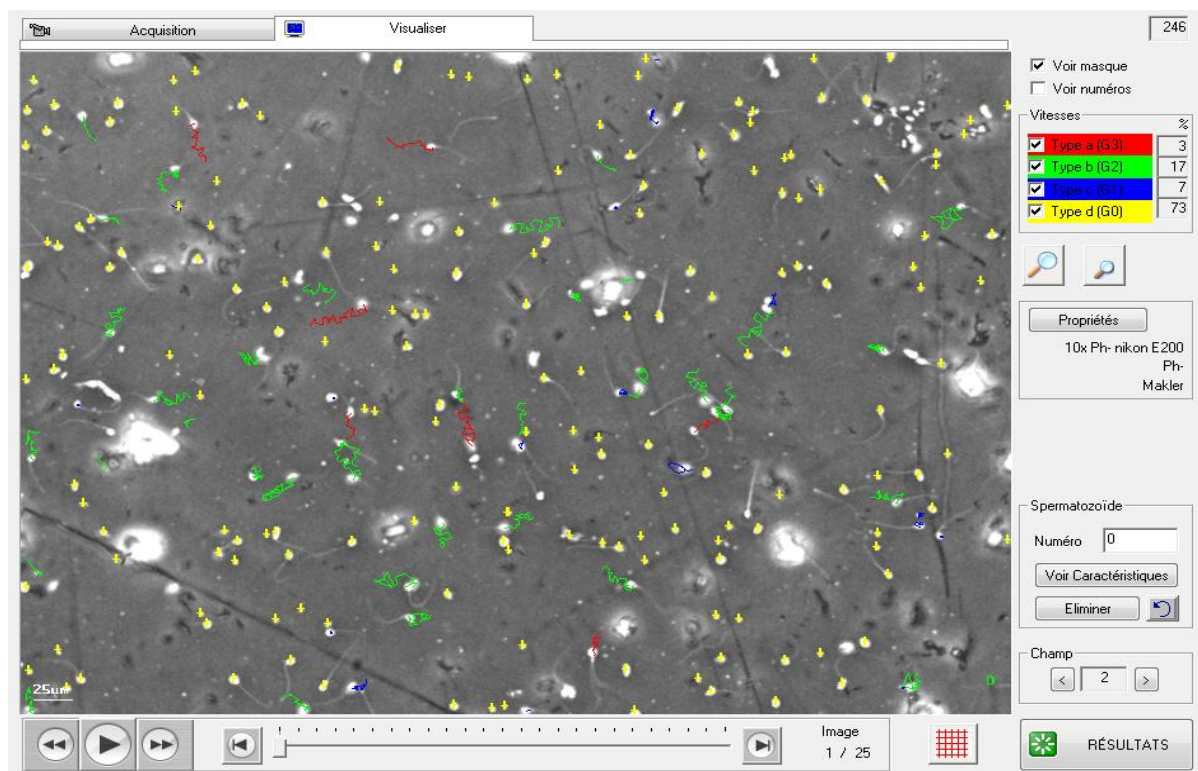
La VE utilisée dans notre expérimentation est encapsulée à l'intérieure des cyclodextrines permettant de : premièrement la protéger contre les facteurs du milieu extérieur (la VE est très sensible à la lumière et à l'air), deuxièmement d'améliorer sa solubilité dans les milieux aqueux. Alors, 2,5 mg de poudre lyophilisé de la VE a été dissoute dans 10 mL de la solution TRIS pour obtenir une concentration de 0,25 mg/mL (Mameri *et al.* 2021).

### ***1.2.5. Mode opératoire***

#### ***1.2.5.1. Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes***

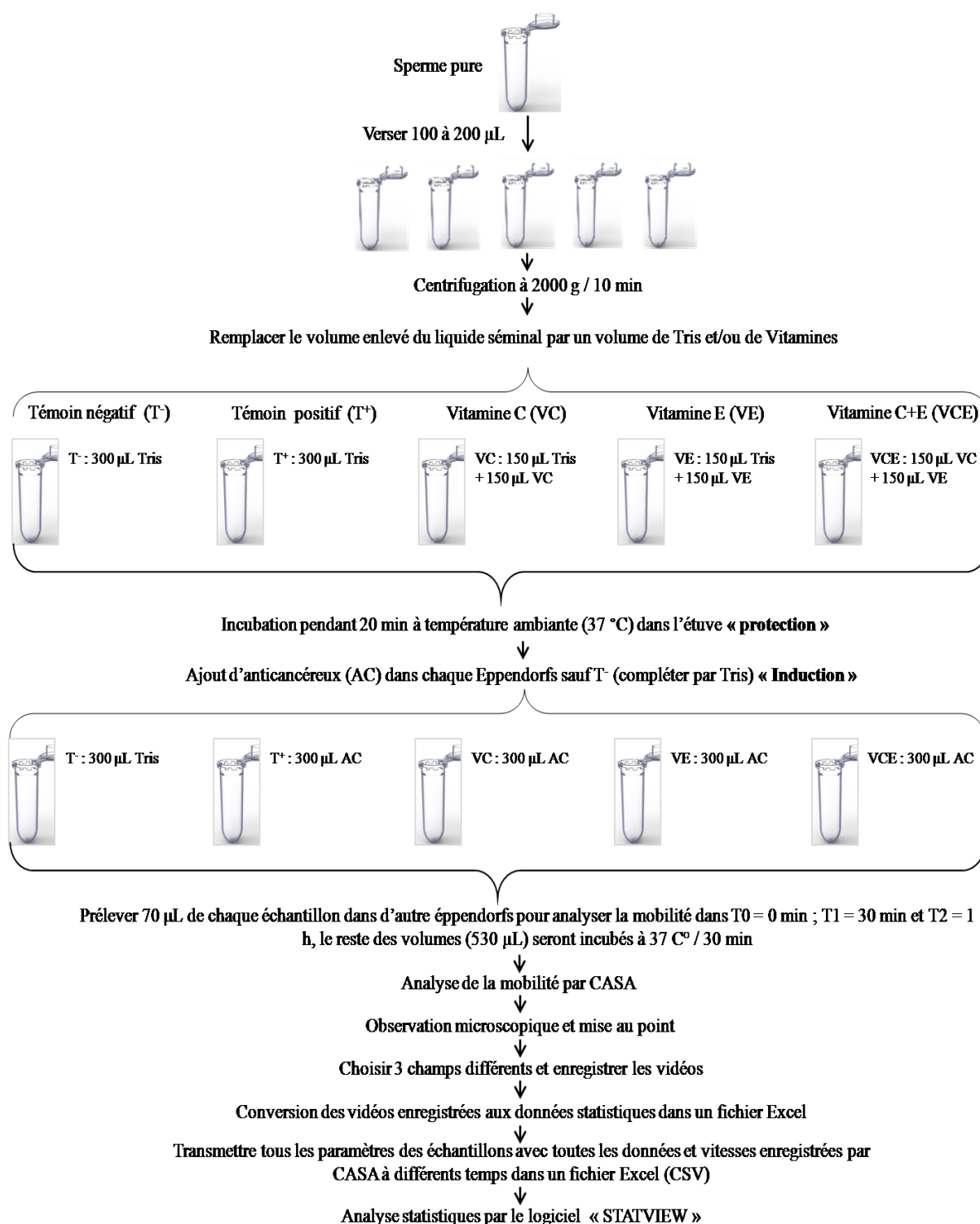
L'évaluation de la mobilité est réalisée au microscope sous grossissement 40, en déposant une goutte de 10 µL de la semence diluée sur la chambre Makler. On estime alors le pourcentage de SPZ mobiles, qui traversent le champ microscopique (**figure 15**) avec une vitesse plus au moins grande, ainsi que d'autres paramètres spermatiques tels que : VSL, VCL, VAP. Ces paramètres ont été évalués toutes les 15 min pour chaque échantillon jusqu'à l'arrêt

total de la mobilité des SPZ à l'aide du Sperm Class Analyzer® (SCA). L'analyseur CASA permet de générer des résultats quantitatifs et objectifs permettant de mettre en évidence l'impact de l'anticancéreux sur la qualité du sperme.



**Figure 15 :** Capture d'écran du logiciel « Sperm Class Analyzer ». Chaque spermatozoïde a une trajectoire représentée avec la couleur correspondante à sa catégorie de mobilité. La mobilité des SPZ est classée comme suit : classe A : motricité progressive rapide ; classe B : mobilité progressive lente ou ralentie ; classe C : motricité non progressive ; classe D : immobilité.

Le schéma ci-dessous (**figure 16**) représente le protocole suivi concernant l'étude de l'effet protecteur des antioxydants à l'égard de la toxicité induite par le CBDCA sur les SPZ matures.

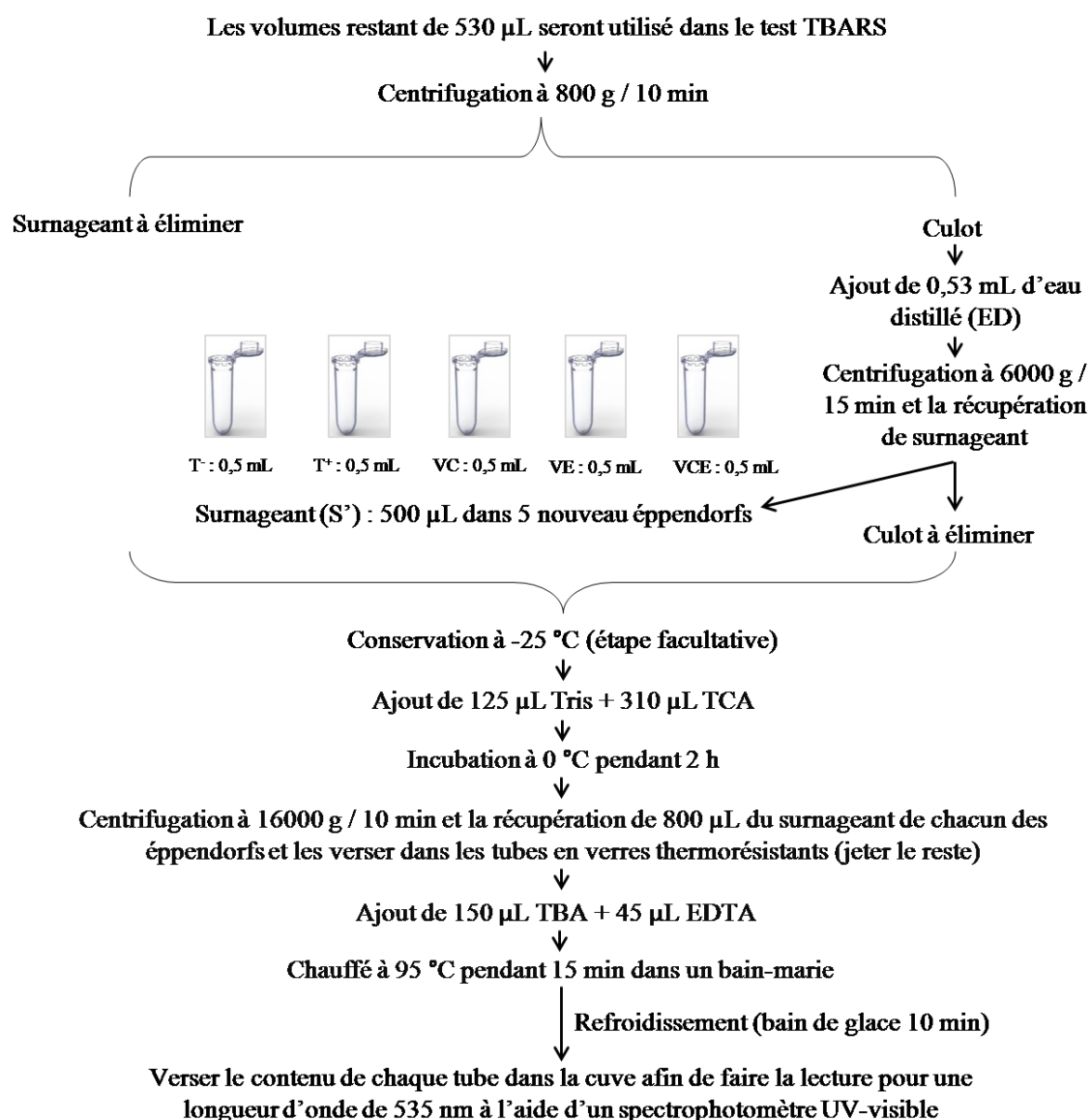


**Figure 16 :** Protocole de l'étude de l'effet protecteur des antioxydants à l'égard de la toxicité induite par le carboplatine sur les spermatozoïdes matures.

#### 1.2.5.2. Test du dosage des malondialdéhydes

Pour la détermination de la PL, la concentration de sperme dans le culot final a été ajustée à 20 millions de SPZ/mL après environ 4 h de co-incubation avec différents traitements. La concentration des MDA a été mesurée séparément dans les SPZ en utilisant le

dosage de l'acide thiobarbiturique (**figure 17**). Brièvement, après 50 min de co-incubation des SPZ avec les différents traitements décrits dans le protocole précédent (**figure 16**), tous les échantillons ont été centrifugés à 800 g / 10 min pour séparer les SPZ des milieux de traitement. De l'eau distillée a été ajoutée aux culots afin de lyser les cellules spermatiques libérant ainsi leurs contenus (MDA, débris cellulaires...) suivie par une centrifugation. Ensuite, un volume ( $\mu\text{L}$ ) d'acide trichloracétique (TCA) et un volume ( $\mu\text{L}$ ) de TRIS sont rajoutés, incubés à 0 °C pendant 2 h. Après centrifugation, un volume de TBA ( $\mu\text{L}$ ) et un volume d'EDTA ( $\mu\text{L}$ ) ont été ajoutés à chaque tube. Les échantillons ont été bouillis dans un bain-marie pendant 15 min puis refroidis dans un bain de glace. Enfin, l'absorbance a été mesurée à 535 nm. Le coefficient d'extinction molaire des MDA est de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Les résultats ont été exprimés en  $\mu\text{mol MDA}/10^8 \text{ SPZ}$  (Barradas et al. 2021)



**Figure 17** : Protocole de la peroxydation lipidique (test TBARS).

### *1.2.5.3. Analyse statistique*

Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SD. Les données expérimentales de la mobilité ont été analysées par le logiciel « STATVIEW : SAS Institute Inc. Version 5 », alors que les résultats du dosage de TBARS ont été analysés par le logiciel « GraphPad Prism : GraphPad Software, LLC. Version 9.4.0.673 ». \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 ; et \*\*\*p < 0,001 par rapport au T<sup>-</sup> (Tris). #p < 0,05 ; ##p < 0,01 ; et ###p < 0,001 par rapport au T<sup>+</sup> (CBDCA).

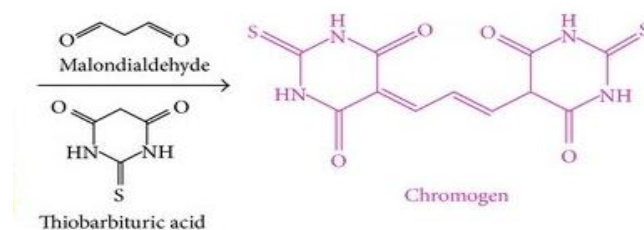
## II. Résultats

Cette partie se rapportera à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus à savoir :

- Etude de l'altération de la mobilité spermatique induite par le CBDCA ainsi que l'évaluation de l'effet cytoprotecteur des vitamines C, E seuls ou combinés en préservant la mobilité des SPZ traités avec le même anticancéreux.
- Détermination du mécanisme moléculaire impliqué dans cette altération en évaluant le SO par la mesure du taux des MDA produites.

Il est admis que la mobilité de la cellule spermatique est révélatrice de son état physiologique et des impacts négatifs qu'elle subit, ce qui la rend un bon modèle pour réaliser des études. Le CASA permet de générer des résultats quantitatifs et de produire ainsi des résultats objectifs permettant de mettre en évidence l'impact des différents traitements sur la qualité du sperme. Parmi ces critères les paramètres de la mobilité spermatique (VAP, VSL, VCL et le % des PR) sont retenus.

Le degré de la PL dans les SPZ humains traités avec l'anticancéreux CBDCA a été révélé par la mesure de la concentration des MDA (produit secondaire de l'oxydation des lipides) en utilisant le test TBARS. Ce test donne un chromogène rose qui peut être quantifié avec un spectrophotomètre après la réaction de deux molécules de TBA avec une molécule de MDA (**figure 18**), à des températures élevées et à un pH bas (Barradas *et al.* 2021).



**Figure 18** : Formation de complexe 2TBA-1MDA (Zeb *et al.* 2016).

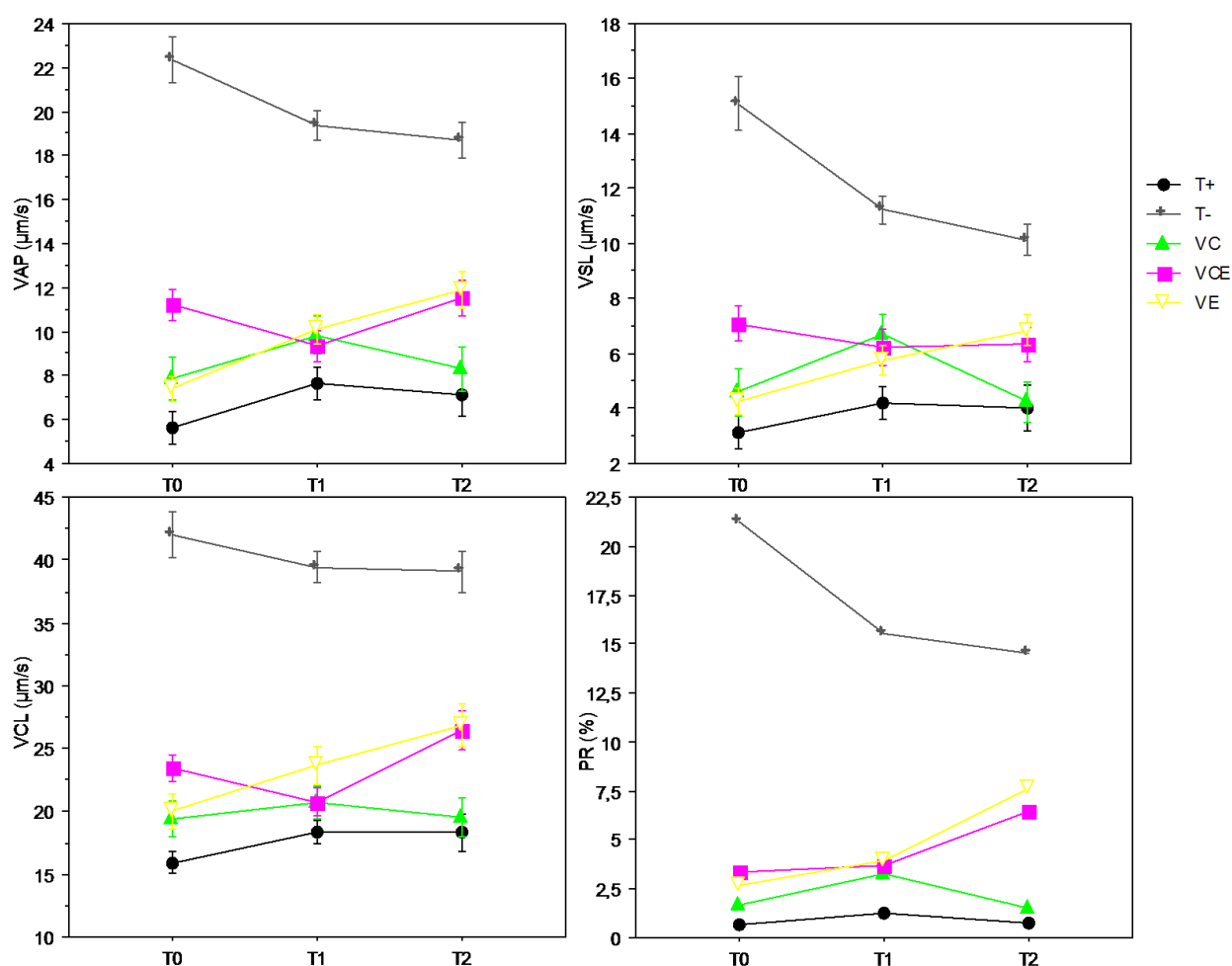
L'absorbance a été mesurée à 535 nm. Le coefficient d'extinction molaire du MDA est de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Les résultats ont été exprimés en  $\mu\text{mol MDA} / 10^8 \text{ SPZ}$ .

### II.1. Effet protecteur des vitamines C, E seuls ou combinés sur la motilité spermatique à l'égard de l'effet délétère du carboplatine

Après traitement des SPZ comme il a été déjà décrit dans le premier protocole, la mobilité a été analysée après 0 min (T0), 30 min (T1) et 60 min (T2) d'incubation.



Une différence significative a été observée dans les paramètres de la mobilité entre le témoin négatif (T<sup>-</sup>) et le témoin positif (T<sup>+</sup>). La **figure 19** montre une diminution significative pour tous les paramètres de la mobilité des SPZ traités par le CBDCA comparés au témoin négatif durant tous les temps d'incubation. Cela, indique un effet délétère sur la motilité spermatique. Toutefois, une diminution importante de ces paramètres a été constaté après 30 min (T1) d'incubation avec le CBDCA (VCL = 18,34 ± 0,93 µm/s ; VSL = 4,2 ± 0,61 µm/s ; VAP = 7,67 ± 0,72 µm/s) où la plupart des SPZ sont statiques. Ces résultats révèlent un effet proportionnel au temps (temps dépendant) sur les SPZ.



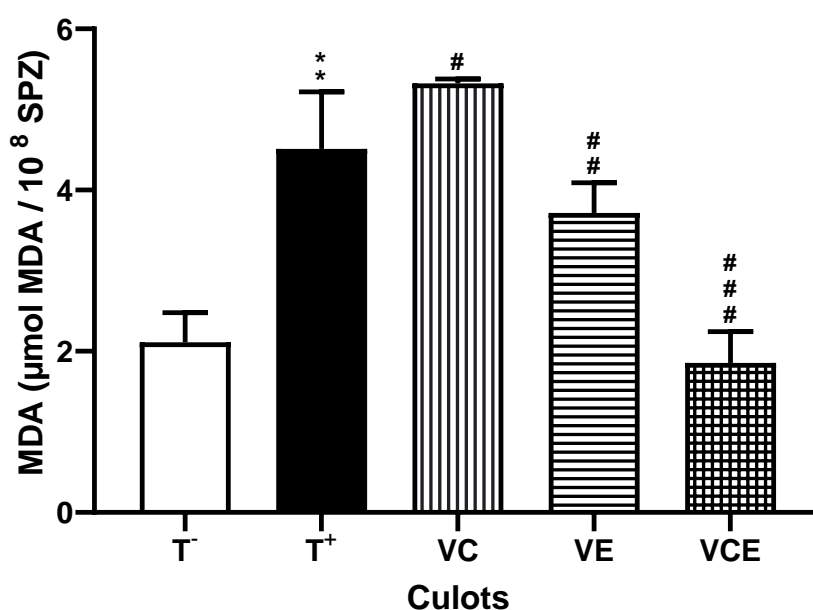
**Figure 19 :** Les paramètres de mobilité spermatique (VAP, VSL, VCL et % des PR) après incubation des spermatozoïdes avec le carboplatine prétraité par les vitamines C, E seuls ou combinés pendant (T0 : 0 min, T1 : 30 min et T2 : 60 min). T<sup>-</sup> : témoin négatif sans le carboplatine, T<sup>+</sup> : témoin positif contenant le carboplatine, VC : vitamine C + carboplatine, VE : vitamine E + carboplatine et VCE : vitamine C + vitamine E + carboplatine.

Une différence dans les résultats des paramètres de mobilité spermatique a été observée entre le témoin négatif, le témoin positif et les antioxydants testés (VC, VE et VCE). Dans le groupe VC une légère différence dans les paramètres de mobilité des SPZ a été observée où elle augmente (T0 à T1) puis diminue (T1 à T2) (VSL entre 4,25 ± 0,73 et 6,68 ± 0,77 µm/s)

par rapport au groupe  $T^+$  (VSL entre  $3,13 \pm 0,58$  et  $4,2 \pm 0,61$   $\mu\text{m/s}$ ). Cependant, la mobilité des SPZ était significativement élevée dans les groupes VE (augmente de  $T_0$  à  $T_2$ ) et de VCE (régresse de  $T_0$  à  $T_1$  puis augmente de  $T_1$  à  $T_2$ ) où les deux groupes auront presque la même valeur à  $T_2$  qui sont respectivement de ( VSL entre  $4,27 \pm 0,5$  et  $6,86 \pm 0,59$   $\mu\text{m/s}$  ; VSL entre  $6,25 \pm 0,65$  et  $7,09 \pm 0,62$   $\mu\text{m/s}$  ) par rapport au groupe traité par le CBDCA seul (VSL entre  $3,13 \pm 0,58$  et  $4,2 \pm 0,61$   $\mu\text{m/s}$ ).

## II.2. Effet du carboplatine et des vitamines C et E sur l'induction de la peroxydation lipidique dans les spermatozoïdes

La **figure 20** représente le taux des MDA exprimés en  $\mu\text{mol MDA}/10^8$  SPZ produits par les SPZ traités selon différentes conditions de co-incubation après 60 min. Les résultats montrent une différence significative entre tous les groupes. En effet, la formation de MDA a augmenté significativement dans les SPZ traités avec le CBDCA ( $T^+$ ), par rapport au groupe témoin négatif ( $T^-$ ) de même que ceux traités avec CBDCA + VC. Le taux le plus élevé de MDA a été observé dans le groupe VC ( $5,32 \pm 0,04$ ) suivi des deux groupes  $T^+$  ( $4,51 \pm 0,71$ ) et VE ( $3,71 \pm 0,37$ ). Cependant, le taux le plus faible de MDA a été relevé dans le groupe VCE ( $1,85 \pm 0,39$ ). Ainsi, les résultats ci-dessus indiquent que la VC à amplifier le statut oxydatif de la cellule comparer au groupe  $T^+$  et que la combinaison VC et VE ont réduit significativement le SO de la cellule spermatique.



**Figure 20 :** Taux de malondialdéhyde produit par les spermatozoïdes après différents traitements.  $T^-$  = TRIS ;  $T^+$  = TRIS + carboplatine ; VC = TRIS + carboplatine + vitamine C ; VE = TRIS + carboplatine + vitamine E ; VCE = TRIS + carboplatine + vitamine C + vitamine E. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  par rapport au  $T^-$ . # $p < 0,05$  ; ## $p < 0,01$  ; ### $p < 0,001$  par rapport au  $T^+$ .

### III. Discussion

L'espérance de vie des patients atteints du cancer a augmenté de manière considérable grâce au développement des traitements anticancéreux efficaces. Malgré leur efficacité en termes d'inhibition de la croissance tumorale, ils affectent aussi inévitablement les autres tissus et organes normaux comme le système reproducteur engendrant ainsi des effets secondaires. L'infertilité masculine est un effet secondaire fréquent chez les patients cancéreux, dont la plupart des agents anticancéreux sont gonadotoxiques (Ghafouri-Fard *et al.* 2021).

D'insuffisantes études ont été élaborées pour indiquer que les agents de chimiothérapie induisent une infertilité masculine. Certaines expliquent cette dernière par l'effet du traitement sur les cellules souches au cours de la spermatogénèse (dommage au niveau de l'ADN et des modifications de la chromatine), ou par son effet sur les hormones sexuelles, la morphologie des testicules et les paramètres du sperme. Effectivement, de nombreuses recherches ont démontré que les sels de platine induisent l'apoptose (Tharmalingam *et al.* 2020). Le CBDCA possède des effets gonadotoxiques sur les testicules de souris prépubères en réduisant la densité des cellules germinales proliférantes (Allen *et al.* 2020). Après l'administration des agents de chimiothérapie gonadotoxiques, il a été démontré que le patient peut développer une oligozoospermie voire même une azoospermie (Young 2016).

Par conséquent, les effets cytotoxiques directs des anticancéreux sur les cellules spermatiques matures ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents impliqués dans l'altération des paramètres spermatiques, restent inconnus et mal élucidés.

C'est ainsi que l'objectif de notre travail consiste, d'une part à étudier pour la première fois l'impact direct du carboplatine (CBDCA) sur la mobilité des SPZ matures humains et d'élucider le mécanisme moléculaire impliqué dans l'altération de cette mobilité. D'autre part, évaluer l'effet cytoprotecteur des antioxydants (VC et VE) à l'égard de la toxicité induite par le CBDCA.

Notre étude a démontré que la mobilité des SPZ a été directement affectée par le CBDCA en comparaison au T<sup>r</sup>. En effet, des diminutions significatives dans le nombre ainsi que dans la mobilité des SPZ ont été observées après traitement par le CBDCA. Des résultats similaires ont été obtenus dans le % des PR. En revanche, des augmentations significatives

---

des anomalies du sperme et des SPZ non progressifs immobiles ont été observées dans le CBDCA par rapport au T<sup>r</sup>.

La capacité du déplacement des SPZ est considérée comme un facteur clef de la fertilité et qui peut assurer le processus d'insémination. La mobilité des SPZ est susceptible de diminuer lorsque les ERO et les produits finaux de la PL (MDA) augmentent. En effet, le CBDCA produit de grandes quantités des ERO ce qui génère un SO important entraînant ainsi la mort cellulaire et par conséquent l'infertilité (Ghafouri-Fard *et al.* 2021). Dans le corps humain, le niveau des ERO produites à la fois par des sources endogènes et exogènes est maintenu en quantités minimales nécessaires aux processus physiologiques du sperme, tels que la réaction acrosomique et l'interaction SPZ-ovocytes. Le liquide séminal contient des antioxydants qui protègent les SPZ contre les ERO. Mais chez les patients cancéreux traités par les agents de chimiothérapie, des niveaux élevés de ces espèces provoquent un déséquilibre dans la balance oxydants-antioxydants (Haq *et al.* 2020). De ce fait, l'altération du système antioxydant, en particulier du pool de GSH résultant de la réduction des activités de la GPx, de la SOD et d'autres antioxydants (VE et VC), induit des dommages oxydatifs des biomolécules telles que les protéines, les lipides ainsi que l'ADN déclenchant ainsi la mort cellulaire. Cette situation peut s'expliquer par le fait que le CBDCA endommage l'intégrité de la membrane cellulaire en perturbant les lipides et les protéines de la cellule spermatique. Donc, les quantités excessives des ERO générant un SO sont l'un des facteurs les plus délétères qui affectent la fonction des SPZ et la fertilité masculine (Chemlal *et al.* 2021). D'une manière intéressante, nos résultats ont révélé un potentiel effet délétère de CBDCA sur la mobilité des SPZ. Cela n'a jamais été démontré dans la littérature.

Il est à noter que les effets bénéfiques des antioxydants sur l'atténuation des dommages induits par les anticancéreux n'ont pas été vérifiés chez les humains. En outre, il a été démontré, *in vivo* sur modèle animal, que l'administration des antioxydants peut accélérer la mobilité des SPZ (Ghafouri-Fard *et al.* 2021). Pour cela, la thérapie antioxydante a été envisagée et s'est avérée très efficace pour atténuer les dommages oxydatifs ainsi que pour traiter la stérilité masculine. L'action des antioxydants comme la VE et la VC diminuent la production des ERO et améliorent les paramètres spermatiques. Dans cette étude, il a été démontré que les antioxydants comme la VC atténue le SO des SPZ induits par les anticancéreux, chez les rats (Takeshima *et al.* 2021). Il a été aussi constaté que la survie des animaux recevant des antioxydants associés à la chimiothérapie a été augmentée par rapport à ceux recevant la chimiothérapie seule (Haq *et al.* 2020). Une étude a rapporté que

---

l'administration d'une dose unique de VC (1000 mg/j) à 200 sujets avec un indice de masse corporelle croissant et à une tranche d'âge allant de 20 à 60 ans, était capable d'améliorer la concentration et la mobilité des SPZ (Amorini *et al.* 2021). D'autre part, une autre étude a révélé que la mobilité des SPZ augmente chez les hommes infertiles après une administration orale de la VE (Barati *et al.* 2020). Il a été aussi constaté, chez les patients présentant des asthénozoospermiques, une amélioration des paramètres spermatiques après traitement avec du sélénium et/ou de la VE (Parekattil *et al.* 2012, Wirleitner *et al.* 2012).

En effet, la VE est liposoluble et instable, pour améliorer sa stabilité et sa solubilité, son encapsulation dans des cyclodextrines est l'une des stratégies les plus utilisées (Ogawa *et al.* 2021). De ce fait, le traitement à la VE et/ou à la VC peut offrir une meilleure protection contre les dommages oxydatifs des SPZ induits par les anticancéreux. Cette combinaison de la VE, qui rompt les réactions en chaîne des ERO en formant ainsi un tocophéroïne radicalaire relativement stable, avec la VC qui réduit l'oxydation des molécules biologiques, suscite beaucoup d'intérêt quant à leurs utilisations dans l'amélioration de la fertilité masculine. En effet, il a été démontré dans plusieurs études qu'il existe une corrélation positive entre un niveau élevé de VC et la morphologie normale des SPZ, ce qui suggère que cette vitamine possède un rôle crucial dans le maintien de la forme normale des SPZ. Bien que, seule la VC ne puisse pas piéger les radicaux lipophiles dans le compartiment lipidique des SPZ (la membrane), elle peut agir en synergie avec la VE afin de réduire les radicaux peroxydes en réagissant avec les radicaux tocophéroxydes et régénéré ainsi la VE active. Par conséquent, ces vitamines protègent les SPZ contre le développement des attaques oxydatives et des dommages de l'ADN, ce qui améliore ainsi la morphologie et la mobilité des SPZ (Sharma *et al.* 1996, Ritchie *et al.* 2021).

Nos résultats ont révélé des augmentations significatives de la viabilité et dans tous les paramètres cinétiques de la motilité spermatique après le traitement avec les antioxydants seuls ou combinés (VC, VE et VCE) en comparaison avec le témoin positif ( $T^+$ ) et ce dans les différents temps d'incubation. Cela est expliqué par l'effet protecteur de ces antioxydants à l'égard du SO engendré par le CBDCA sur les SPZ. La combinaison des deux vitamines a amélioré la mobilité des SPZ, cela s'explique par un effet synergique de ces deux antioxydants dans la préservation et la protection des SPZ contre les dommages oxydatifs engendrés par l'anticancéreux. Cet effet synergique a été déjà démontré dans des études sur la cryoconservation des spermatozoïdes, dont la combinaison de ces deux vitamines a exercé un effet protecteur (Krishnamoorthy *et al.* 2007, Takeshima *et al.* 2019).

---

L'augmentation de la mobilité des SPZ dans le groupe VC est due à l'effet protecteur de la VC. Le traitement diététique avec cette vitamine a fourni des résultats prometteurs sur l'amélioration des paramètres du sperme (Parekattil *et al.* 2012), cela peut expliquer en partie nos résultats obtenus sur la VC. En effet, de T0 à T1, la VC a protégé les SPZ contre les ERO (augmentation de mobilité), alors que de T1 à T2 nous n'avons pas enregistré de protection due à l'état oxydé de cette vitamine qui ne peut pas se régénérer à son tour (Chan 1993). D'ailleurs, une étude a été réalisée sur des sangliers mâles, a démontré que les vitamines hydrosolubles améliorent la qualité du sperme et augmentent le nombre de cellules mobiles. Il a été démontré dans une autre étude que la VC peut avoir des effets controversés sur les paramètres spermatiques et le taux de fertilité chez les hommes hypofertiles atteints d'oligoasthénospermie idiopathique. Cela peut expliquer la diminution de la mobilité au cours du traitement par VC (Agarwal *et al.* 2011, Hajjar *et al.* 2020). Il est nécessaire de poursuivre les recherches pour confirmer l'efficacité et l'innocuité de supplémentation en antioxydants dans le traitement médical de l'infertilité masculine.

Les SPZ sont particulièrement sensibles aux lésions par les ERO car, d'une part leurs membranes plasmiques sont riches en AGPI et d'autre part, leurs taux cytoplasmiques des enzymes antioxydantes sont extrêmement faibles. Les AGPI sont d'excellents cibles des ERO à cause de la présence des liaisons conjugués dans leurs chaînes carbonées ce qui les transforment facilement en radicaux lipidiques (Ritchie *et al.* 2021). L'induction des cascades de PL est le résultat d'un niveau exacerbé en ERO dans les SPZ, entraînant ainsi une diminution de leurs fonctions (Barati *et al.* 2020). Les MDA sont des marqueurs de la PL et sont utilisés dans des analyses biochimiques pour mesurer le degré d'altération lipidique des SPZ. Les taux élevés des MDA séminaux représentent des degrés élevés de PL ce qui diminuent la fertilité masculine (Ben Ali *et al.* 2012). Le dosage des aldéhydes par l'acide thiobarbiturique (TBA) mesure non seulement le taux des MDA, mais également les peroxydes lipidiques et les produits d'auto-oxydation des acides gras qui donnent naissance à des molécules réagissant avec le TBA. Une découverte intéressante dans la présente étude est que le CBDCA affecte l'intégrité de la membrane et conduit à une exacerbation du SO dans les SPZ. Nos résultats montrent une augmentation significative des taux de MDA dans le groupe T<sup>+</sup> par rapport au groupe T<sup>-</sup>. Cela signifie que ce dérivé de platine contribue à la PL de la membrane des SPZ. Ces résultats ont indiqué que l'oxydation de la membrane lipidique des SPZ pourrait être l'un des mécanismes moléculaires sous-jacents de CBDCA. Nous avons constaté, par ailleurs, plus la concentration des MDA augmente plus la mobilité diminue. Ceci est confirmé par le test TBARS, dont les performances de mobilité des SPZ sont directement

---

liées au SO et à la surproduction des ERO qui deviennent une véritable cause de l'infertilité masculine en raison de leurs effets néfastes sur la qualité et la fonction des SPZ (Chemlal *et al.* 2021). Des études *in vitro* ont trouvé qu'une concentration minimale de CBDCA de 30 ng/mL cause des dommages importants à l'intégrité membranaire des SPZ chez des volontaires sains (Reiter *et al.* 2002). Des études ont démontré que les dérivés de platines tels que CBDCA induisent une oxydation des lipides, exprimé par des taux élevés en MDA (Parekattil *et al.* 2012, Reddy *et al.* 2016, Haq *et al.* 2020). Ces résultats reflètent une certaine cohérence avec ceux obtenus dans notre étude. De plus, une étude réalisée chez des mâles oligoasthénozoospermiques a démontré une corrélation négative entre le taux des MDA et la mobilité, la morphologie ainsi que le nombre de SPZ. En effet, plus les concentrations en MDA sont élevées plus la mobilité et la morphologie sont altérées (Ritchie *et al.* 2021).

Cependant, nos résultats ont révélé que les traitements VE et VCE ont induit une diminution significative des concentrations des MDA par rapport au T<sup>+</sup> (CBDCA). Cela, peut être expliqué par la participation de VE et de VC au piégeage des ERO formées par CBDCA et d'inhiber ainsi la PL des membranes des SPZ. En effet, la diminution des taux de MDA suite au traitement par VE est due à sa propriété antioxydante qui inhibe la PL (Amorini *et al.* 2021). De plus, le taux élevé des MDA observé suite au traitement des SPZ avec la VC, est expliqué par l'effet non protecteur de cette dernière envers les SPZ, ou bien à son interférence avec les produits du test TBARS (Ohkawa *et al.* 1979, Kazmierczak-Baranska *et al.* 2020).

# *Conclusion*



## Conclusion

Dans cette étude, nous avons arrêté comme objectifs, la détermination de l'effet protecteur de deux antioxydants la VC et la VE à l'égard des effets délétères (toxicité) engendrés par le carboplatine (CBDCA) sur les spermatozoïdes (SPZ) humains matures. Aussi, l'évaluation des dommages provoqués par le stress oxydant (SO) en mesurant les produits de la peroxydation lipidique (PL).

Notre approche expérimentale consiste à évaluer les paramètres de motilité spermatique suite à l'exposition des SPZ au CBDCA co-incubés préalablement avec les antioxydants VC et VE (seules ou combinés). Cela, en vue d'apporter une protection contre la cytotoxicité de cet anticancéreux. Nous avons ensuite procédé à évaluer le SO en mesurant le taux de malondialdéhyde (MDA), biomarqueur du degré de la PL, pour mieux déceler le mécanisme moléculaire de ces effets délétères produits par le CBDCA ainsi que le SO qui en résulte.

Au terme de notre travail, nous pouvons conclure que la co-incubation des SPZ matures avec ou sans antioxydants, nous révèle des effets différents. Les résultats d'induction montrent un effet délétère du CBDCA sur la mobilité des SPZ. Le prétraitement avec les différentes molécules antioxydantes diffère également d'un prétraitement à un autre. L'association de la VC et VE a démontré un meilleur effet protecteur contre le CBDCA et un taux de MDA plus faible que celui du témoin négatif; ce qui suggère que cette combinaison atténue le SO qui est certainement le mécanisme principal impliqué dans l'altération du sperme. Donc en déduit la nécessité de l'utilisation de ces antioxydants comme adjuvants pour préserver la fertilité masculine pendant et après les cures de chimiothérapie.

Cela, présente un intérêt majeur pour la mise au point de nouvelles thérapies antioxydants conduisant à l'amélioration de l'infertilité masculine. Des études ultérieures pourraient être entreprises pour rechercher d'autres combinaisons en antioxydants avec des concentrations optimales ayant pour but d'assurer une meilleure protection de la qualité du sperme humain et mettre en œuvre cette thérapie en clinique.

# *Références Bibliographiques*

---

## Références bibliographiques

Abbas, Z. and Rehman, S. (2018). "An Overview of Cancer Treatment Modalities." *Neoplasms*.

Agarwal, A. and Sekhon, L.H. (2011). "Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratospermia: Is it justified?" *Indian Journal of Urology* 27(1): 74-85.

Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., *et al.* (2014). "Effect of oxidative stress on male reproduction." *The World Journal of Men's Health* 32(1): 1-17.

Airley, R. (2009). *Cancer chemotherapy: basic science to the clinic*, John Wiley & Sons.

Alahmar, A.T. (2019). "Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review." *Journal of Human Reproductive Sciences* 12(1): 4-18.

Ali, I., A Wani, W., Saleem, K., *et al.* (2013). "Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 13(2): 296-306.

Allen, C.M., Lopes, F., Mitchell, R.T., *et al.* (2018). "How does chemotherapy treatment damage the prepubertal testis?" *Reproduction* 156(6): R209-R233.

Allen, C.M., Lopes, F., Mitchell, R.T., *et al.* (2020). "Comparative gonadotoxicity of the chemotherapy drugs cisplatin and carboplatin on prepubertal mouse gonads." *Molecular Human Reproduction* 26(3): 129-140.

Amorini, A.M., Listorti, I., Bilotta, G., *et al.* (2021). "Antioxidant-Based Therapies in Male Infertility: Do We Have Sufficient Evidence Supporting Their Effectiveness?" *Antioxidants (Basel)* 10(2).

Baetas, J., Rabaça, A., Gonçalves, A., *et al.* (2019). "Protective role of N-acetylcysteine (NAC) on human sperm exposed to etoposide." 29(1): 1-9.

Baiee, F.H., Haron, A.W., Yusoff, R.H., *et al.* (2017). "Kinetic Motilities of Cryopreserved Bull Spermatozoa: Owing to the Effect of Eurycoma longifolia Jack Aqueous Extract." *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 12(2): 77-84.

Barati, E., Nikzad, H. and Karimian, M. (2020). "Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management." *Cellular and Molecular Life Sciences* 77(1): 93-113.

Bardal, S.K., Waechter, J.E. and Martin, D.S. (2011). "Chapter 20-Neoplasia." *Applied Pharmacology Philadelphia: Content Repository Only*: 305-324.

Barradas, V., Pereira Antoniassi, M., Intasqui, P., *et al.* (2021). "Evaluation of oxidative stress in seminal plasma of adolescents with varicocele." *Reproduction and Fertility* 2(2): 141-150.

Ben Ali, H., Atig, F., Mehri, S., *et al.* (2012). "Analyse du statut oxydatif spermatique chez des patients infertiles." *Basic and Clinical Andrology* 22(4): 233-240.

---

Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., *et al.* (2017). "Oxidative stress and male infertility." *Nature Reviews Urology* 14(8): 470-485.

Bujan, L. and De Mas, P. (2002). "Génotoxicité des chimiothérapies et radiothérapies: Quelles sont les conséquences pour le spermatozoïde humain?" *Andrologie* 12(3): 284-294.

Chan, A.C. (1993). "Partners in defense, vitamin E and vitamin C." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 71(9): 725-731.

Chatelut, E. (2011). "Pharmacology of platinum compounds: differences between the three molecules and factors of interpatient variability." *Bull Cancer* 98(11): 1253-1261.

Chemlal, H., Bensalem, S., Bendiab, K., *et al.* (2021). "High HbA1c levels affect motility parameters and overexpress oxidative stress of human mature spermatozoa." *Andrologia* 53(1): e13902.

Chevreau, C. and Huguet, F. (1995). "Chimiothérapie anticancéreuse et fertilité masculine." *Andrologie* 5(4): 458-464.

Choudhary, R., Chawala, V., Soni, N., *et al.* (2010). "Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility." *Pakistan Journal of Physiology* 6(2): 54-59.

Colvin, M. (2003). "Alkylating agents In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Robert C Bast J, Gansler TS, Holland JF, *et al.*, editors." *Holland-Frei Cancer Medicine*.

de Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., *et al.* (1998). "Spermatogenesis." *Human Reproduction* 13(1): 1-8.

De Luca, M.N., Colone, M., Gambioli, R., *et al.* (2021). "Oxidative Stress and Male Fertility: Role of Antioxidants and Inositols." *Antioxidants (Basel)* 10(8).

Delessard, M., Saulnier, J., Rives, A., *et al.* (2020). "Exposure to Chemotherapy During Childhood or Adulthood and Consequences on Spermatogenesis and Male Fertility." *International Journal of Molecular Sciences* 21(4).

Descôteaux, C. (2013). Développement de nouveaux composés anticancéreux pour le traitement des cancers féminins, Université du Québec à Trois-Rivières.

DeVita, J., Vincent, T. and Edward, C. (2008). "A history of cancer chemotherapy." *Cancer Research* 68(21): 8643-8653.

Dumas, G. and Canet, E. (2016). "Effets cardiovasculaires graves des chimiothérapies, thérapies ciblées et des traitements immunosuppresseurs." *Réanimation* 25(S3): 123-136.

Esteves, S.C. and Miyaoska, R. (2015). Sperm Physiology and Assessment of Spermatogenesis Kinetics In Vivo.

Faure, S. (2010). "Anticancéreux cytotoxiques." *Actualités Pharmaceutiques* 49(497):51.

Feki, N.C., Therond, P., Jouannet, P., *et al.* (2003). "Composition lipidique des spermatozoïdes humains et susceptibilité au stress oxydant avant et après migration dans le mucus cervical." *Andrologie* 13(381-392).

---

Fody, E.P. and Walker, E. (1985). "Effects of drugs on the male and female reproductive systems." *Annals of Clinical and Laboratory Science* 15(6): 451-458.

Ghafouri-Fard, S., Shoorei, H., Abak, A., *et al.* (2021). "Effects of chemotherapeutic agents on male germ cells and possible ameliorating impact of antioxidants." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 142: 112040.

Ghosh, S. (2019). "Cisplatin: The first metal based anticancer drug." *Bioorganic Chemistry* 88: 102925.

Griswold, M.D. (2016). "Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis." *Physiological Reviews* 96(1): 1-17.

Guichard, N., Guillarme, D., Bonnabry, P., *et al.* (2017). "Antineoplastic drugs and their analysis: a state of the art review." *Analyst* 142(13): 2273-2321.

Haghi-Aminjan, H., Asghari, M.H., Farhood, B., *et al.* (2018). "The role of melatonin on chemotherapy-induced reproductive toxicity." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 70(3): 291-306.

Hajjar, T., Soleymani, F. and Vatanchian, M. (2020). "Protective Effect of Vitamin C and Zinc as an Antioxidant Against Chemotherapy-Induced Male Reproductive Toxicity." *Journal of Medicine and Life* 13(2): 138-143.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., *et al.* (2007). "Le stress oxydant." *Revue médicale de Liège* 62.

Haq, A.A., Khan, M., Khalid, S., *et al.* (2020). "Role of antioxidant in chemotherapy related infertility." *Pakistan Journal of Physiology* 16(1): 14-16.

Hong, C., Chiang, B., Ku, J., *et al.* (1985). "Screening the in vitro sperm-immobilizing effect of some anticancer drugs." *Human Toxicology* 4(4): 461-464.

Iammarrone, E., Balet, R., Lower, A., *et al.* (2003). "Male infertility." *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 17(2): 211-229.

Jones, R. (1998). "Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis." *Journal of Reproduction Fertility Supplement* 53: 73-84.

Kazmierczak-Baranska, J., Boguszewska, K., Adamus-Grabicka, A., *et al.* (2020). "Two Faces of Vitamin C-Antioxidative and Pro-Oxidative Agent." *Nutrients* 12(5).

Krausz, C. (2011). "Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis." *Best Practice Research Clinical Endocrinology Metabolism* 25(2): 271-285.

Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Arunkumar, A., *et al.* (2007). "Ameliorative effect of vitamins (alpha-tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm." *Reproductive Toxicology* 23(2): 239-245.

Lafont, C. and Tassart, M. (2010). "Imagerie du tractus génital chez l'homme infertile." *Médecine de la Reproduction* 12(3): 242-248.

Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., *et al.* (1996). "Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy." *Human Reproduction Update* 2(3): 246-256.

Lu, J.-C., Huang, Y.-F. and Lü, N.-Q. (2010). "WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: its applicability to andrology laboratories in China." *Zhonghua Nan Ke Xue= National Journal of Andrology* 16(10): 867-871.

Ma, Y., He, X., Qi, K., *et al.* (2019). "Effects of environmental contaminants on fertility and reproductive health." *Journal of Environmental Sciences(China)* 77: 210-217.

Mameri, A., Bournine, L., Mouni, L., *et al.* (2021). "Oxidative stress as an underlying mechanism of anticancer drugs cytotoxicity on human red blood cells' membrane." *Toxicology in Vitro* 72: 105106.

Matumo, P., Lutegha, M., Jeannot, J., *et al.* (2021). "Intérêt de la biochimie du plasma séminal dans l'exploration de l'infertilité masculine : revue narrative."

Mohanty, S.K. and Singh, R. (2017). *Overview of the Male Reproductive System*, Springer.

Mortimer, S.T. (2000). CASA—practical aspects. *Journal of Andrology*. 21: 515-524.

Naz, M. and Kamal, M. (2017). "Classification, causes, diagnosis and treatment of male infertility: a review." *Oriental Pharmacy Experimental Medicine* 17(2): 89-109.

Nishimura, H. and L'Hernault, S.W. (2017). "Spermatogenesis." *Current Biology* 27(18): R988-R994.

Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J.L., *et al.* (2011). "Analysis of anticancer drugs: a review." *Talanta* 85(5): 2265-2289.

Ogawa, S., Katsuragi, H., Iuchi, K., *et al.* (2021). "Clarification of the Complexation Behaviour of 2, 6-di-O-Methylated  $\beta$ -Cyclodextrin and Vitamin E and Radical Scavenging Ability of the Complex in Aqueous Solution." *Journal of Oleo Science*: ess21064.

Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979). "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction." *Analytical Biochemistry* 95(2): 351-358.

Oun, R., Moussa, Y.E. and Wheate, N.J. (2018). "The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists." *Dalton Transactions* 47(19): 6645-6653.

Parekatil, S.J., Esteves, S.C. and Agarwal, A. (2012). *Male infertility: contemporary clinical approaches, andrology, ART & antioxidants*, Springer.

Pena, F.J., O'Flaherty, C., Ortiz Rodriguez, J.M., *et al.* (2019). "Redox Regulation and Oxidative Stress: The Particular Case of the Stallion Spermatozoa." *Antioxidants* 8(11).

Puyo, S., Montaudon, D. and Pourquier, P. (2014). "From old alkylating agents to new minor groove binders." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 89(1): 43-61.

---

Qu, N., Itoh, M. and Sakabe, K. (2019). "Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis: The Role of Testicular Immunology." *International Journal of Molecular Sciences* 20(4).

Rabaca, A., Ferreira, C., Bernardino, R., *et al.* (2020). "Use of antioxidant could ameliorate the negative impact of etoposide on human sperm DNA during chemotherapy." *Reproductive Biomedicine Online* 40(6): 856-866.

Reddy, K.P., Madhu, P. and Reddy, P.S. (2016). "Protective effects of resveratrol against cisplatin-induced testicular and epididymal toxicity in rats." *Food and Chemical Toxicology* 91: 65-72.

Reiter, W.J., Tomek, S., Zielinski, C.C., *et al.* (2002). "Effect of carboplatin on the functional integrity of the human sperm membrane in vitro." *Journal of Andrology* 23(3): 338-340.

Ribas-Maynou, J. and Yeste, M. (2020). "Oxidative Stress in Male Infertility: Causes, Effects in Assisted Reproductive Techniques, and Protective Support of Antioxidants." *Biology (Basel)* 9(4).

Ritchie, C. and Ko, E.Y. (2021). "Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility." *Andrologia* 53(1): e13581.

Rives, N., Milazzo, J.-P., Arkoun, B., *et al.* (2012). "Gamète mâle... un spermatozoïde ou une spermatide?" *Gynécologie Obstétrique et Fertilité* 40(11): 671-674.

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

Saïdi, R., Rives, N., Gruel, E., *et al.* (2008). "Nouvelle classification du spermocytogramme à fort grossissement." *Médecine de la Reproduction* 10(5): 315-324.

Schilit, S.L.P. (2019). Uncovering novel cytogenetic and molecular etiologies for male infertility, Harvard University.

Schlatt, S. and Ehmcke, J. (2014). "Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 29: 2-16.

Schrader, M., Müller, M., Straub, B., *et al.* (2001). "The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic basis and clinical aspects." *Reproductive Toxicology* 15(6): 611-617.

Sharma, R.K. and Agarwal, A. (1996). "Role of reactive oxygen species in male infertility." *Urology* 48(6): 835-850.

Shati, A.A. (2019). "Resveratrol improves sperm parameter and testicular apoptosis in cisplatin-treated rats: Effects on ERK1/2, JNK, and Akt pathways." *Systems Biology in Reproductive Medicine* 65(3): 236-249.

Smith, S. and Prewett, S. (2017). "Principles of chemotherapy and radiotherapy." *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine* 27(7): 206-212.

Sprauten, M., Brydøy, M., Haugnes, H.S., *et al.* (2014). "Longitudinal serum testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone levels in a population-based sample of long-term testicular cancer survivors." *Journal of Clinical Oncology* 32(6): 571-578.

Takehima, T., Kuroda, S. and Yumura, Y. (2019). "Cancer chemotherapy and chemiluminescence detection of reactive oxygen species in human semen." *Antioxidants* 8(10): 449.

Takehima, T., Usui, K., Mori, K., *et al.* (2021). "Oxidative stress and male infertility." *Reproductive Medicine and Biology* 20(1): 41-52.

Taouzinet, L., Fatmi, S., Khellouf, A., *et al.* (2022). "Drug Release, Stability And Efficiency Of Vitamin E Loaded In Liposomes For Bovine Sperm Protection In Cryopreservation Medium." *CryoLetters* 43(1): 50-57.

Tapia, J.A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., *et al.* (2012). "The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope." *Reproduction in Domestic Animals* 47 Suppl 3: 65-75.

Tharmalingam, M.D., Matilionyte, G., Wallace, W.H.B., *et al.* (2020). "Cisplatin and carboplatin result in similar gonadotoxicity in immature human testis with implications for fertility preservation in childhood cancer." *BMC Med* 18(1): 374.

Thomas, F. and Chatelut, E. (2007). "Les dérivés du platine." *Oncologie* 9(11): 741-745.

Thurston, D.E. and Pysz, I. (2021). *Chemistry and pharmacology of anticancer drugs*, CRC press.

Todd, A., Groundwater, P.W. and Gill, J.H. (2018). *Anticancer therapeutics: from drug discovery to clinical applications*, John Wiley & Sons.

Vakalopoulos, I., Dimou, P., Anagnostou, I., *et al.* (2015). "Impact of cancer and cancer treatment on male fertility." *Hormones* 14(4): 579-589.

Vassilakopoulou, M., Boostandoost, E., Papaxoinis, G., *et al.* (2016). "Anticancer treatment and fertility: Effect of therapeutic modalities on reproductive system and functions." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 97: 328-334.

Wagner, H., Cheng, J.W. and Ko, E.Y. (2018). "Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature." *Arab Journal of Urology* 16(1): 35-43.

Wirleitner, B., Vanderzwalmen, P., Stecher, A., *et al.* (2012). "Dietary supplementation of antioxidants improves semen quality of IVF patients in terms of motility, sperm count, and nuclear vacuolization." *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 82(6): 391-398.

Yamaguchi, K. and Fujisawa, M. (2011). "Anticancer chemotherapeutic agents and testicular dysfunction." *Reproductive Medicine and Biology* 10(2): 81-87.

Young, J. (2016). "Infertilité masculine: Mécanismes, causes et exploration." *Clinical Medicine Insights Endocrinology and Diabetes* 80: 29-36.



Zeb, A. and Ullah, F. (2016). "A simple spectrophotometric method for the determination of thiobarbituric acid reactive substances in fried fast foods." *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2016.

## Résumé

Bien que les progrès récents dans le traitement du cancer ont prolongé la survie des patients et amélioré leur qualité de vie néanmoins, les effets secondaires sur la reproduction restent toujours préoccupants. L'infertilité est un effet néfaste fréquent chez les patients cancéreux sous thérapies à base de carboplatine (CBDCA). L'utilisation d'un traitement antioxydant est l'une des stratégies efficaces suggérées pour diminuer la toxicité gonadique du CBDCA. Par ailleurs, l'effet cytotoxique direct sur les spermatozoïdes (SPZ) matures, dont les mécanismes moléculaires impliqués restent méconnus et mal élucidés. A cet égard, cette présente étude consiste, d'une part, à étudier l'impact direct de CBDCA sur les SPZ matures et d'autre part, à évaluer le rôle protecteur des antioxydants (vitamine C et vitamine E seules ou associées) contre la toxicité induite par cet anticancéreux. L'exposition directe des SPZ au CBDCA et leur co-incubation avec des antioxydants ont été analysées en mesurant les paramètres de mobilité à l'aide d'un analyseur de sperme assisté par ordinateur (CASA) et leur état de stress oxydant (SO) correspondant à travers le dosage des malonyldialdéhydes (MDA). Les résultats ont démontré que le CBDCA affecte significativement la mobilité des SPZ ( $VSL = 4,03 \pm 0,86 \mu\text{m/s}$ ) par rapport au témoin négatif ( $VSL = 10,13 \pm 0,56 \mu\text{m/s}$ ), notamment après 60 min de co-incubation. Ainsi, le CBDCA induit une peroxydation des lipides membranaires ( $MDA = 4,51 \pm 0,71 \mu\text{mol}/10^8 \text{ SPZ}$ ) en comparaison au témoin négatif ( $MDA = 2,11 \pm 0,37 \mu\text{mol}/10^8 \text{ SPZ}$ ). En outre, la combinaison de vitamine E et C ( $VSL = 6,33 \pm 0,64 \mu\text{m/s}$ ) exerce un potentiel effet protecteur contre le CBDCA qui se caractérise par un effet synergique. Finalement, le CBDCA affecte la mobilité des SPZ par l'exacerbation du SO, qui est considéré comme un mécanisme sous-jacent altérant ainsi la fonction des SPZ en diminuant la capacité de la fertilité masculine. Cependant, les antioxydants (vitamines C et E) peuvent réduire, voire prévenir ces effets néfastes du CBDCA grâce à leur activité inhibitrice de la peroxydation lipidique ( $MDA = 1,85 \pm 0,39 \mu\text{mol}/10^8 \text{ SPZ}$ ).

**Mots-clés :** Carboplatine, infertilité masculine, spermatozoïdes, mobilité, stress oxydant, MDA, vitamine C, vitamine E.

## Abstract

Although recent advances in cancer treatment have prolonged patient survival and improved their quality of life however, reproductive side effects are still worrying. Infertility is a common adverse effect in cancer patients on carboplatin-based therapies (CBDCA). The use of antioxidant therapy is one of the effective strategies suggested to decrease the gonadal toxicity of CBDCA. Moreover, the direct cytotoxic effect on mature spermatozoa (SPZ), whose molecular mechanisms involved remain unknown and poorly elucidated. In this respect, this present study consists, on the one hand, to study the direct impact of CBDCA on mature SPZ and on the other hand, to evaluate the protective effect of antioxidants like vitamin C and vitamin E alone or combined against the toxicity induced by this anti-cancer drug. Direct exposure of SPZ to CBDCA and their co-incubation with antioxidants were analyzed by measuring motility parameters using a computer-assisted sperm analyzer (CASA) and their state of corresponding oxidative stress (OS) through malonyldialdehydes assay (MDA). The results demonstrated that CBDCA significantly affects SPZ motility ( $VSL = 4.03 \pm 0.86 \mu\text{m/s}$ ) compared to the negative control ( $VSL = 10.13 \pm 0.56 \mu\text{m/s}$ ), especially after 60 min of co-incubation. Thus, CBDCA induces membrane lipid peroxidation ( $MDA = 4.51 \pm 0.71 \mu\text{mol}/10^8 \text{ SPZ}$ ) compared to the negative control ( $MDA = 2.11 \pm 0.39 \mu\text{mol}/10^8 \text{ SPZ}$ ). In addition, the combination of vitamin E and C ( $VSL = 6.33 \pm 0.64 \mu\text{m/s}$ ) exerts a potential protective effect against CBDCA which is characterized by a synergistic effect. Finally, CBDCA affects SPZ mobility through exacerbation of OS, which is believed to be an underlying mechanism thereby impairing SPZ function by decreasing male fertility capacity. However, antioxidants (vitamins C and E) can reduce or even prevent these harmful effects of CBDCA due to their inhibitory activity of lipid peroxidation ( $MDA = 1.85 \pm 0.39 \mu\text{mol}/10^8 \text{ SPZ}$ ).

**Keywords:** Carboplatin, male infertility, spermatozoa, motility, oxidative stress, MDA, vitamin C, vitamin E.

## ملخص

على الرغم من أن التطورات الحديثة في علاج السرطان قد أدت إلى إطالة بقاء المريض وتحسين نوعية حياتهم، إلا أن الآثار الجانبية الإنجابية لا تزال مصدر قلق. العقم هو تأثير ضار متكرر في مرضى السرطان على العلاجات القائمة على الكاربوبلاتين (CBDCA). يحد استخدام العلاج المضاد للأكسدة أحد الاستراتيجيات الفعالة المقترحة لتقليل سمية الغدد التناسلية لـ CBDCA. علاوة على ذلك، فإن التأثير المباشر للسام للخلايا على الحيوانات المنوية الناضج (SPZ)، التي لا تزال آلياتها الجزيئية غير معروفة وسيئة التوضيح. في هذا الصدد، تتكون هذه الدراسة الحالية، من ناحية، من دراسة التأثير المباشر لـ CBDCA على SPZ الناضج ومن ناحية أخرى، في تقييم الدور الوقائي لمضادات الأكسدة (فيتامين C وفيتامين E بمفردهما أو معاً) ضد السمية التي يسببها هذا الدواء المضاد للسرطان. تم تحليل التعرض المباشر لـ SPZ لـ CBDCA واحتضانها المشترك مع مضادات الأكسدة عن طريق قياس معلمات الحركة باستخدام محلل الحيوانات المنوية بمساعدة الكمبيوتر (CASA) وحالة الإجهاد التأكسدي (SO) المقابلة من خلال فحص malonyldialdéhydes (MDA). أظهرت النتائج أن CBDCA يؤثر بشكل كبير على حركة SPZ ( $VSL = 4,03 \pm 0,86 \mu\text{m/s}$ ) مقارنة بالتحكم السلبي ( $VSL = 10,13 \pm 0,56 \mu\text{m/s}$ )، خاصة بعد 60 دقيقة من الحضانة المشتركة. وبالتالي، فإن CBDCA تحفز بيروكسيد الدهون في الغشاء (SPZ  $MDA = 4,51 \pm 0,71 \mu\text{mol} / 10^8$ ) مقارنة بالتحكم السلبي (SPZ  $MDA = 2,11 \pm 0,37 \mu\text{mol} / 10^8$ ) بالإضافة إلى ذلك، فإن مزيج فيتامين C و E ( $VSL = 6,33 \pm 0,64 \mu\text{m/s}$ ) يمارس تأثيراً وقائياً محتملاً ضد CBDCA الذي يتميز بتأثير تآزري. أخيراً، يؤثر CBDCA على تنقل SPZ من خلال تفاقم SO، والذي يُعتقد أنه آلية أساسية وبالتالي إضعاف وظيفة SPZ عن طريق تقليل قدرة الخصوبة عند الذكور. ومع ذلك، يمكن لمضادات الأكسدة (الفيتامينات C و E) أن تقلل أو تمنع هذه الآثار الضارة لـ CBDCA بفضل نشاطها المثبط لبيروكسيد الدهون (SPZ  $MDA = 1,85 \pm 0,39 \mu\text{mol} / 10^8$ ).

**الكلمات المفتاحية:** كاربوبلاتين، عقم الذكور، الحيوانات المنوية، الحركة، الإجهاد التأكسدي، MDA، فيتامين C، فيتامين E.