

# Nouveaux marqueurs séminaux

P. FENICHEL<sup>1,2</sup>, G. POINTIS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Service d'Endocrinologie et Reproduction, Hôpital de l'Archet I, Nice

<sup>2</sup> INSERM EMI 00-09, G.R.E.R. Faculté de Médecine, Av. de Valombrose, Nice

## RÉSUMÉ

Plusieurs protéines détectées dans le liquide séminal ont été proposées comme marqueur de la spermatogenèse afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de l'insuffisance spermatique et servir de facteur pronostic avant biopsie testiculaire. Pour être informative, une telle protéine doit être strictement d'origine testiculaire produite soit par la cellule de Sertoli soit par les cellules germinales, disparaître après vasectomie et être présente à une concentration détectable dans le liquide séminal. L'hormone anti-Müllérienne (AMH) d'origine strictement sertolienne, est sécrétée à l'âge adulte préférentiellement vers la lumière du tube séminifère. Sa concentration séminale semble corrélée à la spermatogenèse. Elle est diminuée en cas d'azoospermie sécrétoire avec hypospermatogenèse et nulle après vasectomie ou en l'absence de toute spermatogenèse complète. Son dosage séminal pourrait représenter un marqueur pronostic simple avant prélèvement testiculaire en vue d'une ICSI.

**Mots Clés :** Spermatogenèse - Marqueur séminal - azoospermie sécrétoire - AMH - ICSI

Les prélèvements testiculaires en vue d'une microinjection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI), ont récemment bouleversé le pronostic de l'azoospermie sécrétoire (AS) et ceci malgré de faibles avancées en terme de physiopathologie hormis la piste génétique des délétions du chromosome Y et la piste toxique concernant les pesticides. Non seulement

l'ICSI s'est avérée possible avec des spermatozoïdes d'origine testiculaire en l'absence de toute maturation épидидymaire, mais en outre l'expérience acquise depuis 1995 semble remettre en question le caractère péjoratif, anciennement jugé rédhibitoire [4, 15], de la réduction du volume testiculaire et/ou de l'élévation du taux plasmatique de l'hormone folliculo-stimulante (FSH).

L'absence de réelles possibilités thérapeutiques avait peu à peu conduit à l'abandon de la biopsie testiculaire en cas d'azoospermie dont le caractère sécrétoire était attesté alors par des antécédents évocateurs comme une cryptorchidie, un faible volume testiculaire et/ou une augmentation du taux plasmatique de la FSH, chacun étant alors convaincu du caractère sévère de l'altération de la spermatogenèse bloquée ou totalement absente. La reprise d'une exploration chirurgicale systématique à la recherche de spermatozoïdes testiculaires en vue d'une ICSI, remet aujourd'hui en question cette vision "manichéenne" d'une absence totale de spermatogenèse dans l'AS. Non seulement les caractéristiques cliniques (antécédents, volume testiculaire, taux plasmatique de FSH) s'avèrent sur le plan individuel de piètres facteurs pronostics [4, 6, 15] mais la biopsie testiculaire elle-même, pourtant réalisée à ciel ouvert dans des conditions adéquates, si elle reste aujourd'hui le moins mauvais facteur prédictif de succès d'un

**Correspondance :** P. Fénelhel, service d'endocrinologie et reproduction, Hopital de l'Archet I, B.P. 3079, 06202 Nice cedex 3.

Communication au Journée de la F.F.E.R. (session SALF-AFU), 20-22 Septembre 2000, Paris

prélèvement ultérieur, ne constitue nullement un élément absolu.

En effet, Tournaye *et al.* [15] rapportent dans l'AS, après un premier prélèvement négatif, 43 % de succès, grâce à des biopsies répétitives. Un tel résultat s'explique aujourd'hui par la notion d'hypospermatogenèse "focalisée" et conduit à une certaine prudence dans l'interprétation de l'examen histologique qui nécessite de toute façon une véritable biopsie testiculaire chirurgicale avec analyse de plusieurs coupes, l'examen d'un minimum de tubes par coupe et l'utilisation d'un score comme celui de Johnsen [6]. Il rend urgente la découverte de marqueurs prédictifs de la persistance d'une hypospermatogenèse, fût-elle localisée, afin d'indiquer la pertinence de la répétition des biopsies.

En effet, la pratique de l'ICSI demande le plus souvent une coordination avec le prélèvement ovocytaire bien que la congélation de spermatozoïdes testiculaires fasse des progrès. Les biopsies répétées ont des implications psychologiques, financières et leurs conséquences médicales à long terme ne sont pas encore parfaitement appréhendées. Ne risque-t-on pas de dire comme D. Dargent il y a quelques années pour la chirurgie de l'ovaire, "pitié pour les testicules !" ? Si l'on regarde le caractère prédictif des facteurs classiques tel qu'il a été récemment analysé, soit de façon rétrospective [15], soit de façon prospective [6], on s'aperçoit que les antécédents cliniques sont peu utiles [6] que les deux facteurs les plus connus, le volume testiculaire et le taux plasmatique de FSH, sont statistiquement corrélés aux chances de récupération de spermatozoïdes testiculaires en cas d'AS, mais que leur valeur prédictive individuelle reste limitée [4, 6, 15].

La figure 1 montre d'après une étude prospective réalisée dans notre groupe au cours de l'AS [8], que certains patients avec une FSH subnormale ont une biopsie négative alors que d'autres patients malgré une FSH élevée (>15UI/L) présentent néanmoins les stigmates d'une hypospermatogenèse persistante. L'analyse histologique représente un élément important du pronostic [6] mais posant le problème de sa répétition en cas d'absence de spermatogenèse.

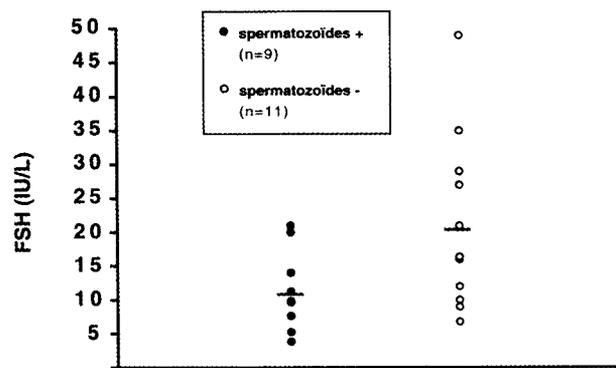


Figure 1. FSH plasmatique (UI/L) dans un groupe de 23 patients atteints d'azoospermie sécrétoire, en fonction de la présence ou non de spermatozoïdes sur la biopsie testiculaire chirurgicale réalisée sur chacun des deux testicules : les barres horizontales représentent les valeurs moyennes. Plusieurs symboles sont superposés. Les concentrations de FSH sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ) dans les deux groupes [8].

L'idée qu'un facteur d'origine testiculaire puisse être évalué dans le plasma séminal avec une valeur indicative de la qualité et/ou de la quantité de la spermatogenèse remonte déjà à plusieurs années (voir revue dans [14]) et avait été envisagée pour de nombreux facteurs séminaux comme la lactate deshydrogénase X (LDH-X) isoenzyme spécifique de l'épithélium germinale [11, 12], certains facteurs de croissance [9, 10] ou la transferrine [2]. Une telle approche est susceptible à la fois d'améliorer notre compréhension des déficiences de la spermatogenèse et de fournir une indication prédictive sur les chances de récupération de spermatozoïdes testiculaires. Dans ce but, il est nécessaire de sélectionner une ou plusieurs protéine(s) spécifiquement sécrétée(s) par les cellules de Sertoli ou les cellules germinales, ce qui n'était pas le cas de la transferrine, qu'elle soit impliquée directement ou indirectement dans la spermatogenèse, que sa concentration séminale soit suffisante pour y être dosée en routine et devienne nulle après vasectomie. L'origine des protéines séminales peut être diverse (glandes annexes, épидидyme, tube séminifère). Seules les protéines spécifiquement issues du tube séminifère et sécrétées soit par la cellule de Sertoli soit par les cellules germinales présentent un véritable intérêt en ce qui concerne les troubles de la spermatogenèse.

Il est admis généralement qu'une molécule issue du tube séminifère sera diluée 50 fois dans le liquide séminal, indépendamment du fait que certaines protéines puissent être réabsorbées ou sécrétées en aval du testicule.

L'inhibine B représente théoriquement un candidat intéressant. Il s'agit de l'isoforme circulante impliquée dans la régulation de la FSH. Elle est sécrétée chez l'homme essentiellement au niveau testiculaire par la cellule de Sertoli aussi bien vers le pôle basal (circulation sanguine) que vers le pôle apical (tube séminifère). Elle joue vraisemblablement un rôle paracrine sur les cellules germinales et présente une concentration séminale suffisante pour y être détectée et disparaît en cas de vasectomie [1]. Cette concentration séminale est corrélée étroitement dans une population générale à la numération des spermatozoïdes [1]. Néanmoins sa concentration séminale est extrêmement variable même chez le sujet sain et en cas d'oligo/azoospermie (< 20 millions/ml), elle est plus basse chez les sujets présentant une FSH plasmatique élevée (< 7 UI/l), ce qui est en accord avec son rôle endocrinien [1]. En cas d'AS, nous n'avons pas retrouvé de corrélation avec l'état de la spermatogenèse (Fénichel et Coll. résultats non publiés).

Diamandis *et al.* [5] ont rapporté que la prostaglandin D synthase (PGDS) sécrétée par la cellule de Sertoli présentait une concentration séminale bien corrélée à la concentration, la morphologie et la mobilité des spermatozoïdes, diminuant progressivement de l'oligospermie à l'azoospermie et disparaissant après vasectomie.

Afin de caractériser de "nouvelles" protéines sertoliennes ou germinales et/ou d'identifier de nouveaux marqueurs séminaux de la spermatogenèse connus ou non, susceptibles de servir de marqueurs pronostiques en vue d'un prélèvement testiculaire, nous avons constitué depuis plusieurs années au laboratoire, une banque de liquides séminaux à partir de donneurs fertiles présentant un spermogramme normal, de sujets avant et après vasectomie et de patients présentant soit une azoospermie sécrétoire soit une azoospermie excrétoire confirmée par exploration chirurgicale et pré-

lèvements testiculaires. Nous avons par ailleurs, à l'aide d'un certain nombre d'améliorations techniques, mis au point une analyse biochimique par électrophorèse 2D haute performance des protéines séminales, reproductible et analysable à l'aide d'un logiciel adapté (Geribaldi *et al.*, soumis). L'analyse soustractive des liquides séminaux chez le même sujet avant et après vasectomie d'une part, et entre sujets fertiles et présentant une azoospermie sécrétoire d'autre part, laisse apparaître des spots d'intérêt en cours de caractérisation. L'un de ces spots nous a fait évoquer la présence d'hormone anti-Müllérienne (AMH) dans le liquide séminal.

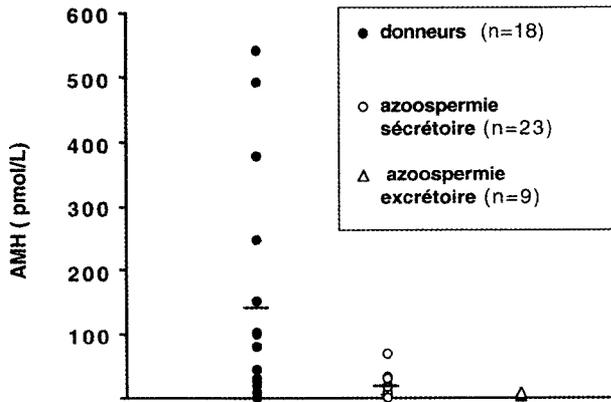
L'AMH est une glycoprotéine de la famille des TGF- $\beta$  comme l'inhibine, strictement d'origine sertolienne dont le principal rôle connu à ce jour, est de permettre la régression des canaux de Müller chez le fœtus mâle. Son taux plasmatique chute considérablement à la puberté en relation avec l'élévation de la testostérone. Des travaux antérieurs réalisés dans le liquide du rete testis de plusieurs mammifères [3] et le liquide séminal humain [7], laissaient apparaître que chez l'adulte mâle, l'AMH pouvait être préférentiellement sécrété par le pôle apical de la cellule de Sertoli vers le tube séminifère (revue dans [8]).

C'est ce que nous avons confirmé en utilisant un test ELISA mis au point par l'équipe de Nathalie Josso [13] et commercialisé par immunotech (Marseille), retrouvant ainsi des concentrations élevées d'AMH dans le liquide séminal de donneurs fertiles, supérieures à celles détectées dans le plasma chez le même sujet (Figure 2). L'AMH séminale était indosable après vasectomie ou en cas d'azoospermie obstructive et à des taux faibles ou nuls (Figure 2) en cas d'azoospermie sécrétoire [8].

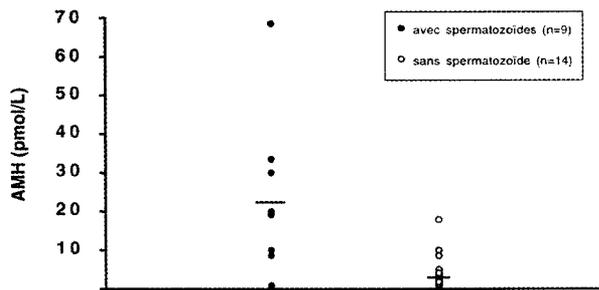
En outre le taux séminal d'AMH était corrélé dans les AS avec l'état de la spermatogenèse, analysé sur une biopsie testiculaire réalisée sur chacun des deux testicules. La valeur prédictive individuelle était meilleure que celle de la FSH plasmatique puisque son taux le plus souvent nul (11/14) en cas d'absence de spermatogenèse avec une valeur prédictive positive de 70 % et une valeur prédictive négative de 83 % (Figure 3). La centrifugation rapide après

## RÉFÉRENCES

1. ANDERSON R.A., IRVINE C.B., GROOME N.P., RILEY S.C. : Inhibin B in seminal plasma: testicular origin and relationship to spermatogenesis. *Hum. Reprod.*, 1998, 4 : 920-926.
2. BARTHELEMY C., KHALFOUN B., GUILLAUMIN J.M., LECOMTE P., BARDOS P. : Seminal fluid transferrin as an index of gonadal function in men. *J. Reprod. Fert.*, 1988, 827 : 113-118.
3. CAZORLA O., SECK M., PISSELET C. : Antimüllerian hormone (AMH) secretion in prepubertal and adult rams. *J. Reprod. Fert.*, 1998, 112 : 259-266.
4. CHEN C.S., CHU S.H., LAI Y.M., WANG M.L., CHAN P.R. : Reconsideration of testicular biopsy and follicle-stimulating hormone measurement in the era of intracytoplasmic sperm injection for non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 1996, 10 : 2176-2179.
5. DIAMANDIS E.P., ARNETT W.P., FOUSSIAS G. *et al.* : Seminal plasma biochemical markers and their association with semen analysis findings. *Urology*, 1999, 53 : 596-603.
6. EZEH U.I.O., MOORE H.D.M., COOKE L.D. : Correlation of testicular sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 3066-3074.
7. FALLAT M.E., SIOW Y., BELKER M., BOYD J.K., YOFFE S., MACLAUGHLIN D.T. : The presence of Müllerian Inhibiting Substance in human seminal plasma. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 2163-2169.
8. FENICHEL P., REY R., POGGIOLI S., DONZEAU M., CHEVALLIER D., POINTIS G. : Anti-Müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 2020-2024.
9. GLANDER H.J., KRATZSCH J., WEISBRICH C.H., BIRKENMEIER G. : Insulin-like growth factor-1 and d2-macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 2454-2460.
10. GRUSCHWITZ M., BREZINSSCHEK R., BREZINSSCHEK H.P. : Cytokine levels in the seminal plasma of infertile males. *J. Androl.*, 1996, 17 : 158-167.
11. NOGUERA VELASCO J.A., TOVAR ZAPATA I.T., MARTINEZ HERNANDEZ P., PEREZ ALBACATE M., TORTOSA OLTRA J., PARILLA PARICIO J.J. : Lactic dehydrogenase-C4 activity in seminal plasma and male infertility. *Fertil. Steril.*, 1993, 60 : 331-335.
12. ORLANDO C., CASANO R., CALDINI A.L. *et al.* : Measurement of seminal LDH-X and transferrin in normal and infertile men. *J. Androl.*, 1988, 9 : 220-223.



**Figure 2.** Distribution des valeurs de l'AMH séminale (pmol/L) dans trois groupes d'hommes jeunes : donneurs fertiles, patients présentant une azoospermie excrétoire et patients présentant une azoospermie sécrétoire confirmée chirurgicalement et par une analyse histologique du tissu testiculaire prélevé par biopsie.



**Figure 3.** AMH séminale (pmol/L) dans un groupe de 23 patients atteints d'azoospermie sécrétoire en fonction de la présence ou non de spermatozoïdes sur la biopsie testiculaire chirurgicale réalisée sur chacun des deux testicules. Les barres horizontales représentent les valeurs moyennes. Plusieurs symboles sont superposés. Les concentrations d'AMH sont significativement différentes ( $P < 0,003$ ) dans les deux groupes [8].

liquéfaction du sperme et la congélation immédiate à  $-20^{\circ}\text{C}$  nous paraissent primordiales pour éviter la dégradation de la protéine par les protéases séminales (travaux en cours). Ces résultats réalisés dans le cadre d'une étude prospective sont néanmoins préliminaires, et doivent être confirmés sur une plus grande série avant de proposer le dosage de l'AMH séminale seule ou associée à d'autres marqueurs pour indiquer la répétition des biopsies en cas de prélèvement initial négatif.

13. REY R.A., BELVILLE C., NIHOUL-FEKETE C., *et al.* : Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimullerian hormone measurement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999, 84: 627-631.
14. SHARPE R.M. : Monitoring of spermatogenesis in man - measurement of Sertoli cell- or germ cell-secreted proteins in semen or blood. *Int. J. Androl.*, 1992, 15 : 201-210.
15. TOURNAYE H., VERHEYEN G., NAGY P. *et al.* : Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum. Reprod.*, 1997, 12 : 80-86.

## ABSTRACT

### Seminal markers in secretory azoospermia

P. FENICHEL, G. POINTIS

**Several proteins detected in seminal plasma have been proposed as prognostic factors in patients with secretory azoospermia. These proteins can provide useful information about the state of spermatogenesis in cases of testicular origin. Anti-Müllerian Hormone (AMH) is strictly derived from Sertoli cells and, in adult males, is preferentially secreted into the seminiferous tubule. The seminal AMH concentration has been found to be correlated with spermatogenesis. It may be a useful prognostic factor in the case of secretory azoospermia before testicular sperm recovery for ICSI.**

***Key words:*** *Spermatogenesis, seminal marker, non-obstructive azoospermia, AMH, ICSI*