

Mise en évidence des cellules inflammatoires dans le sperme

M. BELMEKKI, C. CRANZ, A. CLAVERT.

Groupe de Recherche en Andrologie 11, rue Humann Faculté de médecine, Strasbourg

RESUME

Une concentration élevée de cellules rondes dans un sperme réduit la fécondance. Ces cellules peuvent être des cellules germinales immatures résultant d'une souffrance testiculaire accompagnée par la tératospermie, ou des polynucléaires s'ils sont peroxydases positifs. Il arrive que ni la tératospermie, ni la réaction à la peroxydase n'expliquent le nombre élevé de ces cellules. Pour ces spermatozoïdes, nous avons utilisé la coloration de l'estérase non spécifique pour la recherche des macrophages, des plasmocytes et de lymphocytes. Ces trois types de cellules ont été retrouvés dans certains spermatozoïdes non leucospermiques. Ce qui reflète une infection chronique en cours d'évolution. Les macrophages, les lymphocytes et les plasmocytes ont également été retrouvés dans certains spermatozoïdes leucospermiques. La présence des macrophages est corrélée avec celle des plasmocytes ($r=0,65$ - $p=0,01$) et des lymphocytes ($r=0,56$ - $p=0,05$). Entre les plasmocytes et les lymphocytes la corrélation est plus importante ($r=0,91$ - $p=0,001$).

Mots clés : *macrophages ; polynucléaires ; hypofertilité ; sperme.*

INTRODUCTION

Dans les comptes rendus de spermogrammes, on mentionne fréquemment la présence de cellules désignées sous le terme de cellules rondes. Cette dénomination reflète une incertitude quant à la nature et l'origine de ces cellules.

Le diagnostic et le suivi de l'évolution des infections génitales chroniques, restent difficiles même en multipliant les examens, comme la numération des leucocytes dans le sperme ou dans les sécrétions après massage prostatique [12], la culture bactérienne [18, 19], le taux d'immunoglobuline A [7, 20] et l'immunoélectrophorèse [21]. Parmi les différents examens, la numération des polynucléaires (PN), est la plus souvent utilisée dans la pratique quotidienne à cause de sa simplicité, mais son importance et les limites de normalité des polynucléaires restent controversées [8, 25].

Une analyse des spermatozoïdes avec polynucléaires montre que chez certains hommes hypofertiles, sans passé infectieux clinique, on trouve deux fois plus de polynucléaires dans le sperme que chez les hommes fertiles [2]. En cas de leucospermie, la fréquence de l'atteinte de la mobilité est plus élevée que dans une population non leucospermique [24].

L'excès de polynucléaires réduit la mobilité [3, 5], diminue la fécondance des spermato-

zoïdes [17] et le taux de grossesses après transferts d'embryons [8]. Les modifications des propriétés du plasma séminal et des spermatozoïdes causées par la présence des polynucléaires et des macrophages sont à l'origine des troubles constatés [11, 26]. Des travaux ont montré que les macrophages retrouvés en cas d'épididymite chronique [14] réduisent la mobilité et augmentent les anomalies des flagelles des spermatozoïdes.

Dans notre consultation, nous avons constaté que dans certains spermatozoïdes le nombre élevé de cellules rondes ne correspondait pas au nombre de polynucléaires et de cellules germinales immatures. Le but de ce travail a été de rechercher systématiquement les macrophages dans tous les spermatozoïdes ayant un grand nombre de cellules rondes et une tératospermie peu importante.

MATERIEL ET METHODES

Dix sept sujets ayant plus de 2,5 millions/ml de cellules rondes ont été sélectionnés pour l'étude, en prenant soin d'exclure les spermatozoïdes avec une tératospermie importante et un indice d'anomalies multiples (I.A.M.) supérieur à 1,6 [15], témoignant d'une altération testiculaire.

Les polynucléaires ont été mis en évidence par la coloration de la peroxydase, à la benzidine. Les macrophages ont été colorés sur frottis par la coloration de l'estérase non spécifique [22, 27] qui identifie également les plasmocytes et les lymphocytes. Les frottis de sperme ont été fixés pendant 10 minutes entre 4 et 10°C, par une solution tampon à PH 6,6 d'acétone et de formaline. Lavés 3 fois à l'eau, les frottis sont séchés pendant 10 à 30 minutes à température ambiante. Ensuite ils sont incubés pendant 45 minutes à température de la salle dans un milieu contenant un tampon phosphate, de la pararosaniline et de l'acétate alpha méthyl. Finalement les lames sont lavées pendant 1 à 2 minutes dans une eau contenant du vert de méthyl. L'examen au micro-

scope optique se fera après un lavage, séchage et montage.

RESULTAT

1. Aspect des cellules estérase positives

L'activité enzymatique des cellules estérase positives se traduit par la présence de granules cytoplasmiques rouges sombres. Selon l'intensité de la réaction, on distingue 4 nuances de réactions tinctoriales. Les cellules à réactivité forte (+++), moyenne (++) , faible (+) et très faible ou nulle (0 +/-) sont respectivement les macrophages, les plasmocytes, les lymphocytes et autres cellules. L'importance de l'intensité de la réaction cytochimique ne nous permet pas de discerner de façon nette les critères cytologiques des différents types cellulaires. Néanmoins, on peut reconnaître certaines caractéristiques habituelles, en plus de l'intensité de la réaction estérasique. Les macrophages apparaissent comme de grandes cellules, de forme irrégulière (Figure 1a), avec parfois des expansions cytoplasmiques ou pseudopodes (Figure 1b). Les plasmocytes se reconnaissent à leur taille moyenne et leur noyau excentré (Figure 1c). Les lymphocytes sont des petites cellules arrondies, avec un noyau occupant une grande partie de la cellule. En outre, pour confirmer le diagnostic de macrophages, nous avons appliqué notre coloration à des macrophages de souris obtenus par la technique classique de l'injection intrapéritonéale d'huile de paraffine. Les cellules recueillies étaient pour la plus part fortement estérase positives.

2. Répartition des cellules inflammatoires

La recherche des polynucléaires par la coloration de la peroxydase chez les 17 sujets sélectionnés ayant plus de 2,5 millions/ml de cellules rondes a montré 6 cas avec plus de 1 M/ml de polynucléaires. Les 11 cas restants qui ont moins de 1 M/ml de polynucléaires sont considérés non leucospermiques selon

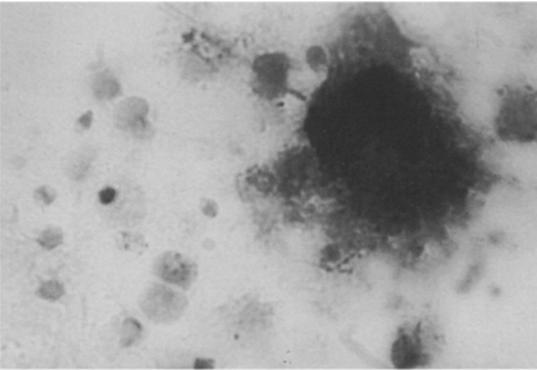
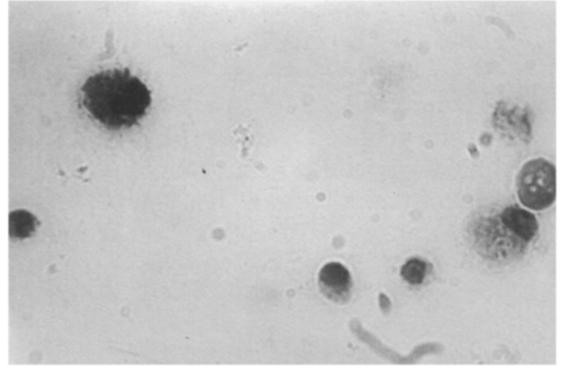
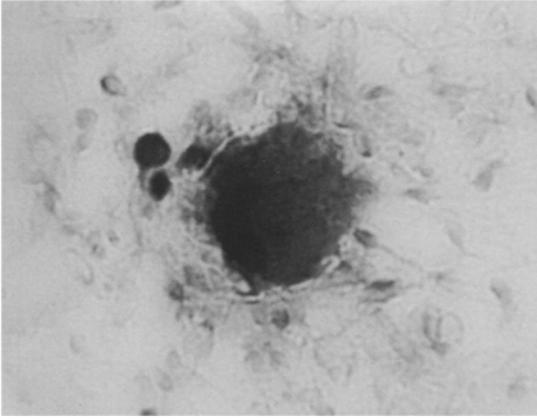


Figure 1 : Cellules estérase positives.

(a) Macrophage au repos.

(b) Macrophage en activité : grande cellule avec des expansions cytoplasmiques.

(c) Plasmocyte : cellule de coloration rouge sombre, taille moyenne, noyau excentré.

les critères de l'OMS (Tableau 1).

La recherche des macrophages, plasmocytes et lymphocytes par la coloration de l'estérase non spécifique, chez les 11 cas non leucospermiques, était positive chez 8 sujets (Tableau 2). La présence de ces cellules traduit un aspect inflammatoire des spermatozoïdes malgré l'absence de polynucléaires. Les paramètres habituels du spermogramme (volume, pH, numération et tératospermie) des 8 sujets estérase positif ne sont pas corrélés avec le taux de macrophages. Chez les 3 sujets restants, estérase négatif, sans polynucléaires et sans macrophages, les cellules rondes observées sont essentiellement des cellules de desquamation du tractus urogénital.

La coloration de l'estérase non spécifique des 6 cas leucospermiques a montré des macrophages, des plasmocytes et des lymphocytes chez 4 sujets. Dans les infections

chroniques, les macrophages accompagnent souvent les polynucléaires. Ce qui fait augmenter le nombre de cellules inflammatoires dans ces spermatozoïdes.

Chez les 17 cas étudiés, le pourcentage de macrophages est corrélé avec celui des plasmocytes ($R=0,65$; $p<0,01$) et avec celui des lymphocytes ($R=0,56$; $p<0,05$). La corrélation est plus importante entre les plasmocytes et les lymphocytes ($r=0,91$; $p<0,001$). Dans un seul cas, nous n'avons pas observé de macrophages malgré la présence de plasmocytes et de lymphocytes. Il semble exister une interdépendance dans la dynamique d'affluence des macrophages, des plasmocytes et des lymphocytes, vers le foyer infectieux.

Chez un patient de notre consultation (N°10755), nous avons suivi l'évolution des cellules rondes sur une période de 14 mois. En général, la tératospermie est restée modérée durant toute la période d'étude (Tableau 4). Ce qui est en faveur d'une faible proportion de cellules germinales immatures chez ce patient. Les polynu-

Tableau 1 : Paramètres des spermogrammes des sujets leucospermiques (PN>1 M/ml) et non leucospermiques (PN<1 M/ml). Les PN ont été colorés par la méthode de la peroxydase.

N	Vol ml	pH	Num M/ml	FN %	I.A.M.	Mob 1 %	Mob 6 %	CR M/ml	PN %
1	2	7,8	4,9	58	1,38	0	0	11	3,3
2	2	7,7	67	58	1,19	80	20	13	0,65
3	1,3	7,8	86	54	1,31	70	5	8	0
4	2,2	7,8	0,2	40	1,38	0	0	17	16,24
5	2	7,3	11	42	1,21	20	0	3	2,1
6	4	8,3	34	38	1,42	60	40	3,8	0,03
7	3,2	7,9	14,1	48	1,16	0	0	6,6	0,66
8	2	7,9	171	40	1,24	60	30	4	0,4
9	1,9	7,9	31	66	1,59	70	40	2,8	0,14
10	1,8	8,5	49	70	1,34	27	0	3,9	3,12
11	1,9	8,4	14,8	38	1,5	75	70	5,4	4,86
12	1,9	8	7	68	1,37	20	5	4,2	0,21
13	1,9	7,8	64	40	1,46	20	0	3	0
14	1,9	8	7	38	1,35	20	5	4,2	0,37
15	1,7	7,2	19	38	1,54	30	10	2,5	0
16	2,5	8	41	58	1,58	75	25	4,2	0,42
17	3	7,8	1,2	38	1,61	10	0	3,2	1,28

Vol=Volume ; Num=Numération ; FN=Formes Normales de spermatozoïdes ; I.A.M.=Index d'Anomalies Multiples ; Mob 1=Mobilité à 1 heure ; Mob 6=Mobilité à 6 heures ; CR=Cellules Rondes ; PN= Polynucléaires.

Tableau 2 : Macrophages, plasmocytes et lymphocytes colorés par la méthode de l'estérase non spécifique chez 11 sujets non leucospermiques (PN<1 M/ml).

N	CPs M/m I	Mac %	Plasm %	Lymp %	Autr C %
2	13	0	4	4	92
3	8	39	3	4	54
6	3,8	14	18	28	40
7	6,6	32	20	24	24
8	4	30	24	34	12
9	2,8	24	20	16	40
12	4,2	0	0	0	100
13	3	0	0	0	100
14	4,2	16	8	16	60
15	2,5	30	22	18	30
16	4,2	30	15	23	32

Mac=Macrophages ; Plasm=Plasmocytes ; Lymp=Lymphocytes ; Autr C=Autres cellules.

Tableau 3 : Macrophages, plasmocytes et lymphocytes colorés par la méthode de l'estérase non spécifique chez 6 sujets leucospermiques (PN>1 M/ml).

N°	CR M/m I	Mac %	Plasm %	Lymp %	Autr C %
1	11	22	22	24	32
4	17	36	20	24	20
5	3	0	0	0	100
10	3,9	18	18	26	38
11	5,4	30	8	9	53
17	3,2	0	0	0	100

Mac=Macrophages ; Plasm=Plasmocytes ; Lymp=Lymphocytes ; Autr C=Autres cellules.

Tableau IV : Evolution des polynucléaires et des cellules rondes d'un patient de notre consultation : on note une disparition totale des PN, alors que les cellules rondes restent élevées.

N°	Mois	FN %	CR M/ml	PN %
1	1	25		3 0
2	2	46	15	10,5
3	4	42	6,5	0,7
4	6	50	11	0
5	8	52	6	0
6	10	28	4	2,4
7	11	60	13	7,8
8	12	72	6	3
9	14	50	18	16

cléaires, révélés par la réaction de la peroxydase, ont diminué jusqu'à disparaître totalement, alors que les cellules rondes sont restées élevées. Nous n'avons pas eu l'occasion de faire la coloration de l'estérase chez ce patient, mais le contexte clinique, la tératospermie et la présence transitoire des polynucléaires font penser à la présence de cellules inflammatoires accompagnant une infection chronique.

DISCUSSION

Dans un précédent travail nous avons étudié la concentration et l'origine des cellules rondes dans les spermés. Nous avons évalué la limite physiologique des cellules rondes à 1 million/ml. Cette population cellulaire est constituée essentiellement de cellules de desquamation du tractus urogénital et de cellules germinales immatures [4, 6].

Dans le présent travail, les 17 cas sélectionnés présentaient plus de 2,5 millions/ml de cellules rondes, une tératospermie peu importante et un I.A.M. normal, suggérant un taux faible de cellules germinales immatures dans l'éjaculat, en relation avec une

atteinte testiculaire. Nous avons constaté que certains spermés non leucospermiques (PN < 1 M/ml) pouvaient contenir des macrophages, des plasmocytes et des lymphocytes (Tableau 2).

La présence de cellules immunocompétentes peut évoquer une production potentielle d'anticorps qui entravent l'activité fonctionnelle des spermatozoïdes [23]. Ce phénomène est d'autant plus évident en cas de leucospermie associée à une insuffisance de la sécrétion de la vésicule séminale [13].

La présence de macrophages reflète un processus inflammatoire chronique évolutif. En pratique les infections chroniques sont souvent cliniquement silencieuses. Les résultats de la bactériologie sont difficilement interprétables en l'absence des polynucléaires. Les cellules inflammatoires observées dans le sperme permettent un diagnostic différentiel entre séquelles d'infection et infection génitale évolutive. L'usage de la méthode de l'estérase non spécifique permet l'identification des macrophages et ainsi de confirmer l'aspect évolutif de l'infection.

Les autres cellules observées, en dehors des cellules inflammatoires (Tableau 2) ne peuvent être que des cellules de desquamation du tractus urogénital et des cellules germinales immatures [4, 6].

La technique de coloration de l'estérase, comparée aux autres méthodes, offre certains avantages : le rapport coût-fiabilité est appréciable. En plus elle met en évidence sur la même lame de frottis plusieurs catégories de cellules (macrophages, plasmocytes, lymphocytes). Il existe une variante de cette coloration permettant de visualiser, sur le même frottis les polynucléaires, les macrophages, les plasmocytes et les lymphocytes, en combinant les colorations de l'estérase et de la peroxydase [27]. Ce qui présente l'avantage d'observer sur la même lame de frottis l'ensemble des cellules rondes pathologiques et physiolo-

giques d'un sperme. Cela n'a pas été fait dans le présent travail puisque ce n'était pas notre objectif initial.

Le cas n° 10755, rapporté dans cette étude illustre bien le problème de l'évolution des cellules rondes en cas d'infection chronique (Tableau 4). Les polynucléaires ont totalement disparu mais le nombre de cellules rondes est resté élevé. Cette situation justifie bien la recherche de macrophages dans le sperme pour confirmer le diagnostic d'infection chronique évolutive.

Les polynucléaires présents dans le sperme peuvent générer des quantités importantes de dérivés actifs de l'oxygène en particulier le peroxyde d'hydrogène [1, 16], responsables de nombreuses altérations des spermatozoïdes [16]. Il semble que le peroxyde d'hydrogène est toxique pour les spermatozoïdes, alors que l'anion superoxyde peut déclencher l'hyperactivation et la capacitation des spermatozoïdes humains [9, 10]. Normalement le plasma séminal possède des facteurs antiperoxydants dont l'activité varie énormément d'un échantillon de plasma séminal à l'autre [16] pour diverses raisons.

CONCLUSION

La coloration de la peroxydase montre les polynucléaires du sperme, alors que la coloration de l'estérase montre les macrophages, les plasmocytes et lymphocytes. Ces deux colorations sont complémentaires. La nature des marqueurs biologiques de l'inflammation au sein d'un foyer de lésion varie en fonction du stade du processus infectieux. La présence en grand nombre de cellules inflammatoires est aussi nocive que celle des germes, pour les spermatozoïdes.

L'infection chronique étant cliniquement silencieuse ou à bas bruit, la diversification et le développement de nouvelles méthodes de recherches de marqueurs d'inflammation, ou d'une infection en cours, améliorent

le diagnostic et contribuent à élucider certains cas d'infécondité inexplicée. Ce qui permet d'accroître les chances de succès en cas de procréation médicalement assistée.

REFERENCES

1. AITKEN R.J., BUCKINGHAM D., WEST K., WU F.C., ZIKOPOULOS K., RICHARDSON D.W. : Differential contributions of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J. Reprod. Fert.*, 1992, 94 : 451-462.
2. AUROUX M., COLLIN C., COUVILLERS M.L. : Do non spermatozoal cells mainly stem from spermiogenesis ? Study of 106 fertile and 102 subfertile men. *Arch. Androl.*, 1985, 14 : 73-80.
3. BERGER R.E., KARP L.E., WILLIAMSON R.A., KOEHLER J., MOORE DE., HOLMES KK. : The relationship of pyospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay. *Fertil. Steril.*, 1982, 37 : 557-564.
4. BOUVOT F. : Contribution à l'étude des cellules rondes du sperme. Thèse. Université Louis Pasteur, faculté de médecine de Strasbourg . 1983, 276 : 53-60.
5. CALDAMONE A.A., EMILSON L.B.V., AL-JUBURI, COCKETT A.T.K. : Prostatitis: prostatic secretory dysfunction affecting fertility. *Fertil. Steril.*, 1980, 34 : 602-603.
6. CLAVERT A., SCHMITT F., CRANZ C., MONTAGNON D. : Etude de l'origine des cellules rondes par le test de l'éjaculation fractionnée. In : Spira A., Jouannet P. Eds. Les colloques de l'INSERM. Facteurs de la fertilité humaine/Human fertility factors. INSERM 1981. 103 : 113-116.
7. CRANZ C., MONTAGNON D., BECKER N., CLAVERT A. : Pathological seminal fluid and IGA. *Infertility*, 1987, 10 : 173-183.
8. DE GEYTER CH., DE GEYTER M., BEHRE H.M., SCHNEINDER H.P.G., NIESCHLAG E. : Peroxydase-positive round cells and microorganisms in human semen together with antibiotic treatment adversely influence the outcome of in-vitro fertilisation and embryo transfer. *Int. J. Androl.*, 1994, 17 : 127-134.
9. DE LAMIRANDE E., GAGNON C. : A positive role for the superoxyde anion in triggering hyperactivation and capacitation of the human spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 1993, 16 : 21-25.
10. DE LAMIRANDE E., GAGNON C. : Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radi. Biol. Med.*, 1993, 14 :

11. EGGERT-KRUSE W., BELLMANN A., ROHR G., TILGEN W., RUNNEBAUM B. : Differentiation of round cells in semen by means of monoclonal antibodies and relationship with male fertility. *Fer il. Steril.*, 1992, 58 : 1046-1055.
12. FARMAN F., DONALD D.F. : Modern concepts on infections of the prostate. *Br. J. Urol.*, 1959, 31 : 176-180.
13. GONZALES G.F., KORTEBANI G., MAZZOLLI A.B. : Leucospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. *Fertil. Steril.*, 1992, 57 : 1058-1065.
14. HAIDL G. : Macrophages in semen are indicative of chronic epididymal infection. *Arch. Androl.*, 1990, 25 : 5-11.
15. JOUANNET P., DUCOT B., FENEUX D., SPIGA A. : Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int. J. Androl.*, 1988, 11 : 379-394.
16. KOVALSKI N.N., DE LAMIRANDE E., GIGNON C. : Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fer il. Steril.*, 1992, 58 : 809-816.
17. MARUYAMA D.K., JR., HALE R.W., ROBBERS B.J. : Effects of white blood cells on the in vitro penetration of zona-free hamster eggs by human spermatozoa. *J. Androl.*, 1985, 6 : 127-135.
18. MEARES E.M., STAMEY T.A. : Bacteriologic localization pattern in bacterial prostatitis and urethritis investigated. *Urology*, 1968, 5 : 492-518.
19. MOBLEY D.F. : Semen cultures in diagnosis of bacterial prostatitis. *J. Urol.*, 1975, 114 : 83-85.
20. NISHUMURA T., MOBLEY D.F., CARLTON C.E. : Immunoglobulin A in split ejaculates of patients with prostatitis. *Urology*, 1977, 9 : 186-187.
21. NISHIMURA T., MOBLEY D.F., CARLTON C.E. : Clinical use of immunoelectrophoresis of split ejaculate : I. Variation of patterns due to antisera. *Urology*, 1977, 9 : 39-41.
22. NISHUMURA T., KANAMORI S., AKIMOTO M., KAWAI H. : Macrophages in prostatic fluid. *Br. J. Urol.*, 1980, 52 : 381-385.
23. PRADIGNAC A., DEMAND R.M., CRANZ C., CLAVERT A. : Antispermatozoal antibodies and genital infection. *Urol. Int.*, 1991, 46 : 18-21.
24. SIGMAN M., LOPES L. : The correlation between round cells and white blood cells in the semen. *J. Urol.*, 1993, 149 : 1338-1340.
25. TOMLINSON M.J., BARRAT C.L.R., COOKE I.D. : Prospective study of leucocytes and leucocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil. Steril.*, 1993, 60 : 1069-1075.
26. WOLFF H., POLITCH J.A., MARTINEZ A., HAIMOVICI F., HILL J.A., ANDERSON D.J. : Leucospermia is associated with poor semen quality. *Fertil. Steril.*, 1990, 53 : 528-536.
27. YAM L.T., LI C.Y., CROSBY W.H. : Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1971, 55 : 283-290.

ABSTRACT

Inflammatory cells in semen

M. BELMEKKI, C. CRANZ, A. CLAVERT

A high level of round cells in semen decreases the fertility capacity. These cells can be either immature germinal cells from testicular disorders characterized by teratospermia, or polymorphonuclear cells if they are peroxidase positive. However it often happens that neither teratospermia nor peroxidase reaction can explain the high proportion of round cells. For these semen we have used the nonspecific esterase staining to search for macrophages, plasma-cells and lymphocytes. These three types of cells were detected in certain non-leucospermic semen which reflects a chronic infection in development. Also these cells, macrophages, plasma-cells and lymphocytes were found in some leucospermic semen samples. If we consider the populations leucospermic and non leucospermic together, macrophages are correlated - with plasma-cells ($r=0,65 - p=0,01$) and with lymphocytes ($r=0,56 - p=0,05$). The correlation between plasma-cells and lymphocytes was more important ($r=0,91 - p=0,001$).