

EXPLORATION DU PLASMA SEMINAL HUMAIN : NOUVELLE APPROCHE PAR LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU PROTON (RMN-¹H)

S. Hamamah, F. Seguin*, C. Barthélémy, A. Fignon, S. Akoba*, A. Lepape*, J. Lansac, D. Royère

Unité de Biologie de la Reproduction, Dept. Gyn-Obs, CHU Bretonneau, 37044 Tours Cedex

* Laboratoire de Biophysique Cellulaire et RMN - INSERM U316, Faculté de Médecine, 37032 Tours Cedex

HUMAN SEMINAL PLASMA : A NEW APPROACH TO ITS ANALYSIS USING PROTON NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (PNMR).

Human seminal plasma glycerylphosphorylcholine (GPC), glycerylphosphorylethanolamine (GPE), citric acid (Cit) and lactic acid (Lac) were analyzed by measuring the peak area of proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectra in four groups of patients : 21 men with secretory azoospermia ; 14 men with excretory azoospermia after vasectomy ; seven patients presenting with very severe oligoasthenoazoospermia ; and 18 normozoospermic subjects. When comparing secretory and excretory azoospermia cases with normozoospermic men, seminal plasma GPC, Cit and Lac peak areas were lower in azoospermic cases compared to normozoospermic men (16.79, 8.18 and 2.28 versus 23.38, 10.58 and 4.3 arbitrary units respectively, $P < 0.01$). The peak area ratios Cit/Lac and GPC/Lac were significantly different between normozoospermic men and either secretory or excretory azoospermic groups ($P < 0.01$). A significant difference was also found in the GPE/GPC peak intensity ratio between secretory and excretory azoospermia cases ($P < 0.001$). These results demonstrate that quantitative markers such as GPC, GPE, Cit and Lac may be useful in the examination of human seminal plasma by proton NMR in infertility investigations. **Key words :** NMR, seminal plasma, azoospermia, human. **Andrologie 1992, 2 : 10-11.**

INTRODUCTION

Le plasma séminal humain contient des sécrétions provenant à la fois des tubules séminifères, de l'épididyme et des glandes annexes.

À l'heure actuelle, l'exploration biochimique du plasma séminal repose surtout sur les dosages de certains marqueurs tels que le fructose pour les vésicules séminales, le zinc, les phosphatases acides, le citrate pour la prostate et la L-carnitine pour l'épididyme. Mais les informations fournies par ces dosages classiques sont parfois limitées et ne permettent pas dans certains cas d'établir un diagnostic précis, dû à une absence de standardisation (7).

L'utilisation de la résonance magnétique nucléaire dans l'exploration biochimique du plasma séminal des patients infertiles relance les voies de la recherche actuelle sur la biochimie du plasma séminal et permet d'avoir une approche plus quantitative, précise et reproductible.

Notre travail a pour but d'identifier et de quantifier par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN-¹H) des marqueurs biochimiques tels que la Glycérylphosphorylcholine (GPC), la Glycérylphosphoryléthanolamine (GPE), l'acide citrique (Cit) et l'acide lactique (Lac) dans le plasma séminal des azoospermies sécrétoires, des oligo-asthénotérazoospermies extrêmes (OAT), des azoospermies excrétoires après vasectomie, et des témoins normospermiques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

4 groupes de patients ont fait l'objet de cette étude: 21 azoospermies sécrétoires, 14 post-vasectomie, 7 OAT sévères et 18 normospermies. Les prélèvements ont été effectués par masturbation après 3 jours d'abstinence. Après liquéfaction, un spermogramme a été réalisé (Tableau. 1). L'azoospermie a été confirmée par l'absence de spermatozoïdes dans le culot après une centrifugation (750 g, 20 min). Les plasma séminaux ont été congelés à - 20 °C jusqu'à l'exploration en RMN-¹H.

Les spectres RMN du ¹H ont été obtenus à 200 MHz à partir de 0,5 ml du plasma séminal dépourvu de débris cellulaires sur un spectromètre AM 200 WB (Bruker). Les acquisitions ont été réalisées après suppression du pic de l'eau par présaturation. Les mesures ont été réalisées par détermination de l'aire des pics sauf pour le rapport GPE/GPC où nous avons utilisé l'intensité des pics à cause de la proximité de ceux ci.

Les valeurs ont été représentées en termes de moyenne \pm SEM. Les comparaisons entre groupes ont été effectuées à l'aide des tests Anova et Mann et Whitney.

Tableau 1. Valeurs moyennes du Glycérylphosphorylcholine (GPC), de l'acide citrique (Cit) et de l'acide Lactique (Lac) dans le plasma séminal des azoospermies sécrétoires, excrétoires (Post-vasectomie) et des normospermies

Définition de la population	N°	Numération		Type de l'aire de pics		
		spz/ml x 10 ⁶	vol/ej.	GPC	Cit	Lac
Azoospermie sécrétoire	21	0	2.15 \pm 0.3	16.79 \pm 1.16 ^a	8.18 \pm 0.79 ^b	2.28 \pm 0.11 ^c
OAT sévère	7	0	5.22 \pm 0.4	18.18 \pm 1.4	10.2 \pm 1.16	2.33 \pm 0.27 ^c
Azoospermie excrétoire	14	0	4.46 \pm 0.4	19.72 \pm 1.54 ^a	9.58 \pm 1.31 ^b	2.43 \pm 0.18 ^c
Normospermie	18	74 \pm 13	3.87 \pm 0.61	23.38 \pm 1.38	10.58 \pm 0.82	4.3 \pm 0.34

a : $P < 0.01$ comparé avec normospermic - b : $P < 0.03$ comparé avec normospermic - c : $P < 0.01$ comparé avec normospermic

RÉSULTATS

Dans cette étude, nous avons comparé la GPC, le Citrate et le Lactate soit individuellement (Tableau 1), soit en termes du rapport GPC/Cit, Cit/Lac, GPC/Lac et GPE/GPC dans tous les groupes (Fig. 1 A). Une différence significative dans les rapports Cit/Lac, GPC/Lac et GPE/GPC a été trouvée entre le plasma séminal des azoospermies sécrétoires ou excrétoires par rapport au groupe témoin normospermique. Cependant, aucune différence n'a été observée pour le rapport GPC/Cit. Mais, seul le rapport d'intensité GPE/GPC montre une différence significative entre les azoospermie sécrétoires et excrétoires ($p < 0,001$; Fig. 1 B).

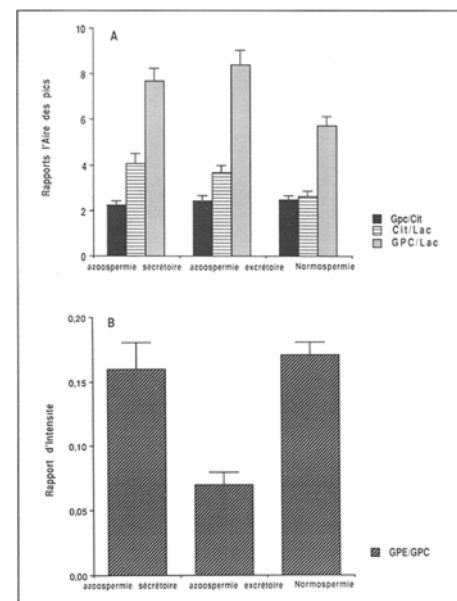


Fig. 1 A : Rapports de l'aire des pics GPC, Cit et Lac en RMN du ¹H pour les azoospermies sécrétoires, excrétoires et les normospermies. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM.

Fig. 1 B : Rapports de l'intensité des pics GPE/GPC en RMN ¹H pour les azoospermies sécrétoires, excrétoires et les normospermies. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM.

DISCUSSION

Si plusieurs études ont montré l'intérêt en RMN in vivo et permis l'évaluation de certaines fonctions testiculaire (3,5), en revanche, peu ont été publiées sur l'usage de la RMN 31p pour étudier l'état fonctionnel de spermatozoïdes humain et animal (1, 4, 6).

Dans notre étude, l'analyse des hormospermies en RMN-H montre que l'aire de pics GPC, Cit et Lac du plasma séminal des normospermes est plus élevé que chez les azospermes ou l'OATs. Il est important de noter qu'à l'exception de l'acide lactique, nous avons observé une grande variabilité inter-individuelle pour la GPC et le Cit. Nous avons confirmé que le plasma séminal des azospermies sécrétoires, excrétoires et/ou des OAT contient moins d'acide lactique que celui de normospermie puisque le taux d'acide lactique est lié au nombre de spermatozoïdes de l'éjaculat.

Théoriquement, la GPC est synthétisée dans l'épididyme, par conséquent, on ne devrait pas en trouver dans le plasma séminal des patients après vasectomie. Mais, nous avons retrouvé un taux de GPC similaire à celui des azospermies sécrétoires chez certains patients vasectomisés. Il est intéressant de noter que nous avons observé une différence significative pour le rapport d'intensité GPE/GPC entre les azospermies sécrétoires et après vasectomies.

Ce rapport apparaît donc comme un excellent paramètre pour déterminer le type de l'azoospermie au contraire de la transferrine séminale qui ne permet pas de différencier l'origine de l'azoospermie (2).

En conclusion, ce travail préliminaire démontre clairement l'importance de la RMN-H dans l'exploration du plasma séminal humain et fournit des données importantes dans le choix thérapeutique de l'hypofertilité masculine.

REFERENCES

- 1 - Bahl, S., Bawa, S.R., Srivastava S., Phadke, R.S., Govil G. : Magnetic resonance studies of intact human spermatozoa. *Physiol. Chem. Phys and Med NMR*.1988., 20: 183-188.
- 2 - Barthélémy C., Khalifoun B., Guillaumin J.M., Lecomte P. Bardos P. : Seminal fluid transferrin as an index of gonadal function in men. *J. Reprod. Fert.* 1988, 82: 113-118.
- 3 - Bax, A. Two dimensional nuclear magnetic resonance in liquids. Ed. Delft University Press. 1984, Holland.
- 4 - Bretan, P.N., Vigneron, D.B., Hricak, H., Tom, R.A., Moseley, M., Tanagho, E.A James, T.L. : Assessment of male infertility: correlation between results of semen analysis and phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *Urology.* 1989, 33: 116-119.
- 5 - Chew, W.M Hricak, H. : Phosphorus-31 MRS of human testicular function and viability. *Investigative Radiology.* 1989, 24: 997-1000.
- 6 - Robitaille, P.M., Robitaille, P.A., Martin, P.A Brown, G. : Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of spermatozoa from the boar, ram, goat and bull. *Comp. Biochem. Physiol.* 1987, 87B: 285-296.
- 7 - Soufir, J.C. : Azoospermie, asthénozoospermie et biochimie séminale. *Ann. Biol. Clin.* 1985, 43 : 67-70.

RÉSUMÉ. Nous avons identifié et évalué par Résonance Magnétique Nucléaire du Proton (RMN-H), dans le plasma séminal humain, des marqueurs biochimiques tels que la Glycérilphosphorylcholine (GPC), la Glycérilphosphoryléthanolamine (GPE), l'acide Citrique (Cit) et l'acide Lactique (Lac). Les valeurs des marqueurs GPC, Cit et Lac sont plus faibles dans les groupes azospermies sécrétoires, excrétoires ou OATs par rapport aux normospermies (16,79; 8,18; 2,28 vs 23,38; 10,58 et 4,3 respectivement; $p < 0,01$). Les rapports de l'aire des pics Cit/Lac et GPC/Lac montrent une différence significative entre les normospermies et les azospermies sécrétoires ou excrétoires ($p < 0,01$). Nous avons également trouvé une différence significative du rapport d'intensité GPE/GPC entre les azospermies sécrétoires et excrétoires ($p < 0,001$). Cette étude nous a permis d'identifier des marqueurs tels que la GPC, la GPE, le Cit et le Lac. Ceux-ci peuvent être utilisés d'une part pour l'exploration du plasma séminal des patients infertiles et d'autre part pour différencier les azospermies sécrétoires des excrétoires. **Mots clés:** RMN, Plasma séminal, azospermie, humain. **Andrologie 1992, 2 : 10-11.**