

# Intérêt du dosage de l'inhibine B et de l'AMH dans le plasma séminal : étude préliminaire

Emma DUVILLA<sup>1</sup>, Isabelle AKNIN-SEIFER<sup>1</sup>, Béatrice TROMBERT-PAVIOT<sup>2</sup>,  
Anne GENTIL-PERRET<sup>3</sup>, Jacques TOSTAIN<sup>4</sup>, Yves MENEZO<sup>5</sup>, Jacques CHOUTEAU<sup>6</sup>,  
Jean-Bernard LAMOULLIATE<sup>7</sup>, Rachel LEVY<sup>1</sup>

1 Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpital Nord ;

2 Service de Santé Publique et de l'Information Médicale (SSPIM), Saint Jean de Bonnefonds ;

3 Anatomopathologie, Hôpital Nord ;

4 Urologie, Hôpital Nord, CHU de saint Etienne, 42055 Saint Etienne.

5 IRH, Clinique du Val d'Ouest, 69130 Ecully

6 Clinilab, 83 av Gabriel Péri, 38400 Saint Martin d'Hères

7 Laboratoire Marcel Mérieux, Avenue Tony Garnier, 69357 Lyon cedex 07

## RÉSUMÉ

**Objectifs :** Le but de notre étude est tout d'abord d'établir des valeurs de référence pour les concentrations d'inhibine B et d'AMH dans le plasma séminal chez des sujets présentant des paramètres spermatiques normaux et altérés. Une analyse préliminaire sera également effectuée afin d'évaluer l'intérêt de ces dosages comme facteur prédictif de biopsie testiculaire positive en cas d'azoospermie non obstructive.

**Patients et Méthodes :** Nous avons dosé l'inhibine B et l'hormone anti-müllérienne (AMH) chez 47 patients présentant des paramètres spermatiques normaux, 28 patients avec une oligozoospermie et 68 patients avec une azoospermie. Les dosages ont été réalisés selon une technique immunoenzymatique de type sandwich.

**Résultats :** Dans les trois groupes, les valeurs d'inhibine B et d'AMH sont très dispersées, mais significativement plus élevées dans les normospermies (inhibine B :  $714,36 \pm 522,66$  ng/l, AMH :  $97,08 \pm 135,15$  pmol/l) que dans les oligospermies (inhibine B :  $417,5 \pm 386,9$  ng/l, AMH :  $62,02 \pm 93,33$  pmol/l) et les azoospermies ( $59,61 \pm 2,65$  ng/l et  $13,12 \pm 31,94$  pmol/l respectivement) ( $p < 0,001$ ). Il existe une corrélation significative ( $p = 0,0054$ ) entre la concentration d'inhibine B dans le plasma séminal et la numération des spermatozoïdes.

Des spermatozoïdes ont été retrouvés chez 11 patients sur les 21 (52,3%) ayant bénéficié d'une biopsie testiculaire. La valeur prédictive de l'inhibine B séminale sur le résultat de la biopsie testiculaire dans les

azoospermies non obstructives a été représentée à l'aide d'une courbe ROC (*receiver operating characteristics*). L'aire sous la courbe pour cette population est de 0,63. La valeur seuil la plus discriminante sur la positivité de la biopsie est de 30 ng/l (sensibilité 66,6%, spécificité 66,6%).

**Conclusion :** Notre étude confirme la corrélation entre les concentrations d'inhibine B et d'AMH dans le plasma séminal et la spermatogenèse. L'intérêt de ces deux marqueurs comme facteur prédictif de la biopsie testiculaire dans les cas d'azoospermie non obstructive reste cependant limité. En effet, cette étude montre que ni l'AMH ni l'inhibine B, seule ou associée à la FSH, ne permettent de prédire le succès de la biopsie testiculaire.

**Mots clés :** inhibine B, AMH, marqueurs séminaux, azoospermie non obstructive, biopsie testiculaire

Correspondance :

Dr Rachel LEVY - Laboratoire de Biologie de la Reproduction,  
Hôpital Nord, CHU de Saint-Etienne,  
42055 Saint-Etienne - Tel 33(4) 77 82 83 07 -  
Fax 33(4) 77 82 87 84 - Email rachel.levy@chu-st-etienne.fr

## I. INTRODUCTION

La possibilité d'utiliser des spermatozoïdes testiculaires prélevés chirurgicalement en vue d'une injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) a considérablement modifié la prise en charge des patients présentant une azoospermie. Cependant, des spermatozoïdes testiculaires ne sont retrouvés que chez environ 50 % des patients présentant une azoospermie ayant bénéficié d'une biopsie testiculaire. De plus, dans le cadre d'une TESE (Testicular Sperm Extraction) – ICSI synchrone, les deux membres du couple sont exposés à des traitements lourds (avec anesthésie générale, le plus souvent) et onéreux : pour l'homme, une intervention chirurgicale, à la recherche de spermatozoïdes testiculaires ; pour la femme, une stimulation hormonale avec recueil d'ovocytes.

Dans ce contexte, une biopsie testiculaire (BT) négative, sans recueil de spermatozoïdes testiculaires, a d'importantes conséquences émotionnelles et financières. Ainsi, s'est développé le besoin de disposer de marqueurs - cliniques, sériques et/ou séminaux - permettant d'évaluer l'état de la spermatogenèse et d'estimer au mieux les chances de trouver des spermatozoïdes testiculaires utilisables en ICSI, sur un mode synchrone (BT et ICSI en même temps) ou différé (avec congélation des spermatozoïdes testiculaires). Plusieurs études ont montré que les principaux marqueurs actuels cliniques (volume testiculaire) et sériques (FSH) n'étaient pas suffisamment discriminants [10, 26, 27].

Aucun des paramètres suivants - présence d'au moins un spermatozoïde lors de l'analyse de sperme préliminaire, volume testiculaire, taux sérique de FSH et présence de spermatozoïdes à l'analyse histologique issue de la biopsie testiculaire - ne représente un facteur prédictif satisfaisant, excepté l'analyse histologique testiculaire [26].

Selon Ezech et al. [10], l'âge du patient, l'index de masse corporelle, le taux de LH et de FSH, et le volume testiculaire ne peuvent pas être utilisés comme facteurs prédictifs de la biopsie testiculaire. En effet, la concentration plasmatique de FSH peut varier pour différentes raisons, indépendamment de la spermatogenèse [18]. Par ailleurs, un grand nombre de patients présentant un arrêt de maturation des cellules germinales lors de la biopsie testiculaire ont un taux de FSH normal. Le volume testiculaire varie en fonction de la race [25] ; de plus la mesure du volume évalué à l'aide d'un orchidomètre manque de précision, celle-ci peut être faussée par l'épididyme ou le scrotum [22]. En revanche, Ezech et al. [10] montrent l'intérêt d'utiliser la combinaison de deux critères histologiques : présence

de spermatozoïdes dans le tissu testiculaire et score de Johnsen, basé sur le nombre de spermatozoïdes observés dans la lumière des tubes séminifères (sensibilité 93%).

D'autres études corroborent ces résultats [7, 20, 24]. Amer et al. [2] montre que la détection de spermatozoïdes ronds dans le sperme par coloration au May-Grunwald-Giemsa est prédictive du succès de la biopsie testiculaire. L'étude de Tsujimura et al. [27] porte également sur des paramètres non invasifs. Elle confirme que le volume testiculaire n'est pas un marqueur discriminant, et établit une équation combinant les taux plasmatiques de FSH, de testostérone et d'inhibine B, pour calculer la probabilité de retrouver des spermatozoïdes à la biopsie testiculaire.

La plupart de ces études montrent en fait, que les seuls paramètres ayant un réel pouvoir prédictif de retrouver des spermatozoïdes testiculaires sont de nature histologique. Il paraît donc intéressant de trouver des paramètres prédictifs non invasifs. Dans ce but, nous avons testé l'intérêt de nouveaux marqueurs séminaux tels l'inhibine B et l'hormone anti-müllérienne (AMH) dans cette indication.

**L'inhibine B** est un produit de l'épithélium séminifère, non stéroïde, inhibant de façon spécifique la FSH. Il s'agit d'une glycoprotéine hétérodimérique de 32 KD, d'origine gonadique exclusive, constituée de deux sous-unités liées par une liaison covalente de type pont disulfure [19] : une sous-unité  $\alpha$  commune (18 KD) et une sous-unité  $\beta$  spécifique (14 KD) existant sous deux formes, A et B ( $\beta A$  et  $\beta B$ ) (Tableau 1). Seules les formes dimériques d'inhibine A ( $\alpha, \beta A$ ) et B ( $\alpha, \beta B$ ) sont biologiquement actives [15]. Seule l'inhibine B est retrouvée chez les sujets masculins, l'inhibine A étant indosable dans le plasma sanguin et séminal.

La cellule de Sertoli est considérée comme la principale source d'inhibine B chez l'homme adulte, mais une étude récente souligne la possibilité d'une production par les cellules germinales [17]. L'inhibine B est sécrétée par la cellule de Sertoli au pôle basal (dans la circulation sanguine) et au pôle apical (dans la lumière des tubes séminifères) [11]. Chez l'homme adulte, la production d'inhibine B est soumise à une double régulation par la FSH et la spermatogenèse [19] : la FSH stimule la production gonadique d'inhibine B et l'inhibine B inhibe la sécrétion de FSH par un mécanisme de rétro-contrôle négatif. Le taux d'inhibine B sérique, corrélé au volume testiculaire et à la numération des spermatozoïdes, a été proposé comme marqueur de la spermatogenèse [3, 16, 19, 30].

Quelques études ont évalué l'intérêt du dosage sérique

de l'inhibine B comme facteur pronostique d'une biopsie testiculaire en cas d'azoospermie non-obstructive : la concentration d'inhibine B est plus élevée en cas de biopsie positive, alors que le volume testiculaire et le taux de FSH seuls ne sont pas discriminants [4]. Dans cette même indication, l'association des deux facteurs, inhibine B sérique et FSH, est plus informative que chacun de ces facteurs utilisés seuls [5]. Cependant, les taux plasmatiques d'inhibine B sont très variables et la valeur d'inhibine B sérique définie comme seuil prédictif de la biopsie testiculaire varie considérablement selon les études : de 13,7 à 95pg/ml [4, 6, 29, 5].

L'inhibine B peut également être détectée dans le plasma séminal, et ce à des taux supérieurs à ceux du sérum [9]. Les taux séminaux d'inhibine B de patients normospermiques fertiles sont supérieurs à ceux de patients azoospermiques [9]. Cependant, les effectifs étudiés sont faibles : 10 patients présentant une normospermie, 50 avec une azoospermie et 10 patients dont le sperme a été étudié dans le cadre d'un contrôle après vasectomie. Cette unique étude publiée ne retrouve pas de différence significative entre les azoospermies obstructives ou sécrétoires.

**L'AMH** est une glycoprotéine dimérique formée de deux monomères de 72 KD, également sécrétée par la cellule de Sertoli (Tableau 1). Elle est responsable de la régression des canaux de Muller chez le fœtus masculin. La production d'AMH dans le plasma séminal est élevée pendant la vie fœtale et reste importante jusqu'à la

puberté, où elle diminue, régulée par la testostérone et l'apparition des premiers spermatozoïdes. Après la puberté, l'AMH est sécrétée de façon préférentielle par le pôle apical de la cellule de Sertoli dans les tubes séminifères, expliquant ainsi la plus forte concentration d'AMH dans le plasma séminal par rapport au sérum, chez l'homme adulte [13, 23].

Comme pour l'inhibine B, les taux d'AMH dans le plasma séminal de donneurs fertiles sont très variables (3 à 340 pmol/l) [12]. Ils sont diminués en cas d'azoospermie sécrétoire, et l'AMH est indétectable en cas d'azoospermie obstructive [12]. La concentration d'AMH dans le plasma séminal pourrait être corrélée à une spermatogenèse persistante chez les patients présentant une azoospermie non-obstructive [12]. Ces observations suggèrent qu'il existe une corrélation entre le taux d'AMH dans le plasma séminal et le statut de la spermatogenèse.

Le but de notre étude est, tout d'abord, compte tenu du très faible nombre de publications consacrées à ces dosages (Tableau 2), d'établir des valeurs de référence pour les concentrations d'inhibine B et d'AMH dans le plasma séminal chez des sujets présentant une normospermie et chez des sujets présentant des paramètres spermatiques altérés. Une analyse préliminaire sera effectuée afin d'évaluer l'intérêt de ces dosages séminaux comme facteur prédictif de biopsie testiculaire positive en cas d'azoospermie non-obstructive.

**Tableau 1 : Caractéristiques des marqueurs étudiés.**

	<b>Inhibine B</b>	<b>AMH</b>
Structure	Glycoprotéine hétérodimérique 2 sous-unités de 18 KD et 14 KD	Glycoprotéine dimérique 2 monomères de 72 KD
Sécrétion	Cellules de Sertoli et cellules germinales Rythme nyctéméral	Cellules de Sertoli Pas de rythme nyctéméral
Variation/âge	Indétectable dans sang de cordon Elevé chez nouveau-né, puis diminue jusqu'à la puberté et augmente après la puberté	Elevé chez fœtus jusqu'à la puberté Diminue après la puberté
Concentration	Plasma séminal > sérum Sérum : 70-330 pg/ml Plasma séminal : 1592-10425 pmol/l [9]	Plasma séminal > sérum Sérum : 26-34 pmol/l Plasma séminal : 3-340 pmol/l [13]
FSH	Corrélation négative	Pas de corrélation
Fonction	Marqueur de la spermatogenèse	Marqueur de la spermatogenèse

**Tableau 2 : Comparaison des études réalisées sur le plasma sérial.**

Inhibine B		AMH		
El Garem [9]	Notre étude	Fénichel [12]	Fujisawa [13]	Notre étude
10 patients avec normospermie 50 patients avec azospermie 10 contrôles post vasectomie	47 patients avec normospermie 28 oligospermies 67 azospermies dont 13 contrôles post vasectomie	18 donneurs normospermiques 7 azospermies obstructives 23 azospermies non-obstructives	39 patients avec oligospermie 10 volontaires fertiles	47 patients avec normospermie 28 patients avec oligospermie 67 azospermies dont 13 contrôles post vasectomie
Technique IE* kit Oxford	Technique IE kit Oxford	Technique IE kit AMH/MIS Elisa Immunotech	Technique IE kit Sérotec Oxford	Technique IE kit AMH/MIS Elisa Immunotech
Concentration : ng/l : Normospermie : 1592-10425 Azoospermie : 15- 702	Concentration : ng/l Normospermie : 33-2673 Oligospermie : 24-1000 Azoospermie : 15-388	Concentration : pmol/l Normospermie: 3,5 - 543 Azoospermie: 3,5-68,5	Concentration : pmol/l Normospermie: 249 Oligospermie : 140	Concentration : pmol/l Normospermie : 0,7-605,31 Oligospermie : 0,7-430 Azoospermie: 0,7-150

\*immuno-enzymatique

## II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. Patients

Nous avons dosé l'inhibine B et l'AMH dans le plasma séminal pour trois groupes de patients âgés de 20 à 48 ans. Tous les patients ont bénéficié d'un spermogramme dans le cadre d'un bilan d'infertilité du couple ou masculine, hormis les patients ayant subi une vasectomie. Le premier groupe est composé de 47 patients présentant des paramètres spermatiques normaux, le deuxième est constitué de 28 patients avec une oligozoospermie. Le troisième groupe comporte 67 patients avec une azoospermie (confirmée après centrifugation, sur deux prélèvements à trois mois d'intervalle) dont 49 cas d'azoospermie sécrétoire non obstructive.

Pour tous les patients, un interrogatoire soigneux a été effectué et une anamnèse complète a été obtenue. En cas d'altération des paramètres spermatiques, un bilan clinique et biologique complet a été effectué : examen clinique, échographie testiculaire (mesure du volume testiculaire classé selon deux catégories : volume normal et inférieur à la normale) et prostatique, bilan hormonal (FSH, LH, testostérone, inhibine B), bilan génétique (caryotype, recherche des microdélétions du chromosome Y, analyse des mutations de CFTR dans le cadre de la mucoviscidose).

A l'issue de ce bilan biologique et clinique, les azoospermies ont pu être classées en azoospermie obstructive ou sécrétoire et différentes étiologies ont été retrouvées : 11 patients ont eu un traitement stérilisant, 8 présentent un syndrome de Klinefelter, 3 sont porteurs d'une microdélétion du chromosome Y, 3 sont atteints de mucoviscidose, 13 ont eu une vasectomie ; dans 29 cas (27 à composante sécrétoire, 2 à composante obstructive), l'azoospermie est demeurée inexplicite. Parmi les 49 patients présentant une azoospermie non obstructive, 21 ont bénéficié d'une biopsie testiculaire.

### 2. Préparation du plasma séminal et dosage

Après information et accord écrit des patients, le sperme est recueilli par masturbation puis, immédiatement après liquéfaction, centrifugé 5 minutes à 3000 tours/minute. Le surnageant est très rapidement et soigneusement récupéré et congelé en cryotubes à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Dans un premier temps, nous avons comparé sur 13 échantillons en parallèle deux températures de conservation en cryotubes : à  $-196^{\circ}\text{C}$ , dans l'azote liquide, et à  $-20^{\circ}\text{C}$  au congélateur. Aucune différence significative dans les résultats des dosages d'inhibine B séminale n'a été observée (données non communiquées). Nous avons donc choisi de conserver

les échantillons à une température  $-20^{\circ}\text{C}$  au congélateur. Par ailleurs, une anti-protéase a été ajoutée (Complete Mini, Roche Diagnostics®) dans le plasma séminal, immédiatement après décongélation, avant le dosage, afin d'homogénéiser l'échantillon et d'éviter une action enzymatique pouvant interférer avec le dosage de l'inhibine B.

Le dosage de l'inhibine B a été réalisé selon la technique de Groome utilisant une technique ELISA (Enzyme-linked Immuno Assay) sandwich (kit inhibine B Oxford Innovation®) avec deux anticorps monoclonaux, l'un spécifique de la sous-unité  $\beta\text{B}$  de l'inhibine, l'autre dirigé contre la sous-unité  $\alpha$  et couplé à la phosphatase alcaline. Il s'agit d'une technique délicate, longue et entièrement manuelle. Les principaux pièges du dosage sont l'extraction (en présence de SDS à  $100^{\circ}\text{C}$ ), la saturation pour les fortes concentrations, une demi-vie courte et une reproductibilité médiocre dans les valeurs faibles. Il n'existe aucun contrôle de qualité national ou international du dosage des inhibines : afin de valider ce dosage, 2 contrôles de qualité internes (un pour une valeur faible, 25, l'autre pour des valeurs plus fortes, 150) ont ainsi été rajoutés systématiquement dans chaque série (contrôles Biorad) et leurs valeurs interprétées selon les règles de Wetsgard.

Le dosage d'AMH est également réalisé selon une technique immunoenzymatique de type sandwich (kit ELISA/MIS, Immunotech®) en deux étapes. Pour ce dosage, une gamme de dilution est réalisée à partir d'un standard dont la concentration en AMH humaine est de 14000 pmol/l. Pour les échantillons contenant de très faibles concentrations d'AMH, un protocole ultra sensible spécifique est recommandé, avec une gamme de dilution différente.

### 3. Biopsie testiculaire et analyse histologique

Le prélèvement de parenchyme testiculaire est réalisé sous anesthésie générale en effectuant une incision sur toute la longueur de chaque testicule. Une petite pièce opératoire issue de la biopsie est fixée dans une solution de Bouin pour l'analyse histologique : les résultats sont exprimés selon le score de Valette [28]. Nous proposons une classification simplifiée en : syndrome de Sertoli Cell Only (SCO), arrêt de maturation, hypo-spermatogenèse ou spermatogenèse normale. D'autres prélèvements de tissu testiculaire effectués en différentes zones sur les deux testicules sont envoyés au laboratoire de biologie de la reproduction pour la recherche de spermatozoïdes testiculaires, après dilacération soignée, et éventuelle congélation si des spermatozoïdes sont retrouvés en nombre suffisant.

#### 4. Application pratique : intérêt dans le suivi d'un traitement antiviral

Plusieurs paramètres - FSH sérique, inhibine B sérique et séminale, AMH séminale, virémie, numération et mobilité des spermatozoïdes - ont été évalués chez un patient présentant une oligo-asthéo-térazoospermie avec virémie positive pour l'hépatite C avant, pendant et après traitement antiviral par bithérapie (interféron, ribavirine).

#### 5. Analyse statistique

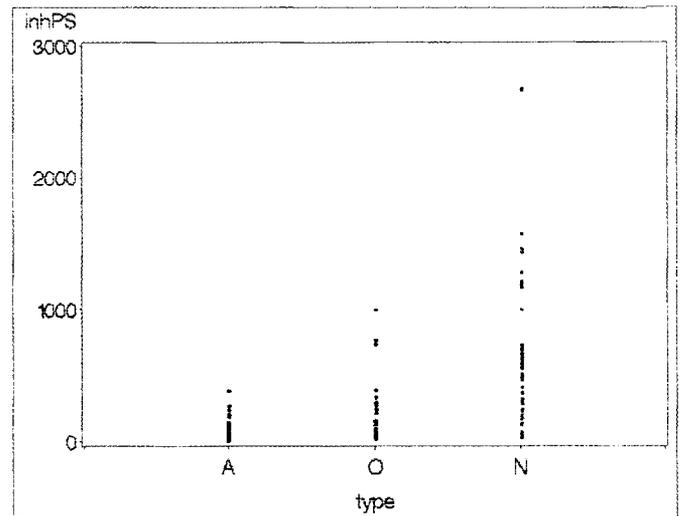
Le coefficient de corrélation de Pearson a été utilisé pour évaluer les corrélations entre la concentration d'inhibine B dans le plasma séminal et le taux de FSH sérique. La comparaison des moyennes des différents paramètres biologiques des différents groupes a été réalisée par un test F d'analyse de la variance. Le seuil de significativité choisi était  $p < 0,05$ . La valeur prédictive de l'inhibine B séminale sur le résultat de la biopsie testiculaire a été analysée à l'aide d'une courbe ROC (Receiver Operating Characteristics) ; la spécificité est représentée sur l'axe des abscisses et la sensibilité sur l'axe des ordonnées. Le calcul de l'aire sous la courbe donne une mesure quantitative de la fonction discriminante de l'inhibine B sur la positivité ou la négativité de la biopsie testiculaire. Une aire égale à 0,5 correspond à une absence de discrimination. L'ensemble des analyses statistiques a été effectué avec le logiciel statistique SAS®.

### III. RÉSULTATS

#### 1. Analyse descriptive : concentrations d'inhibine B et d'AMH dans le plasma séminal

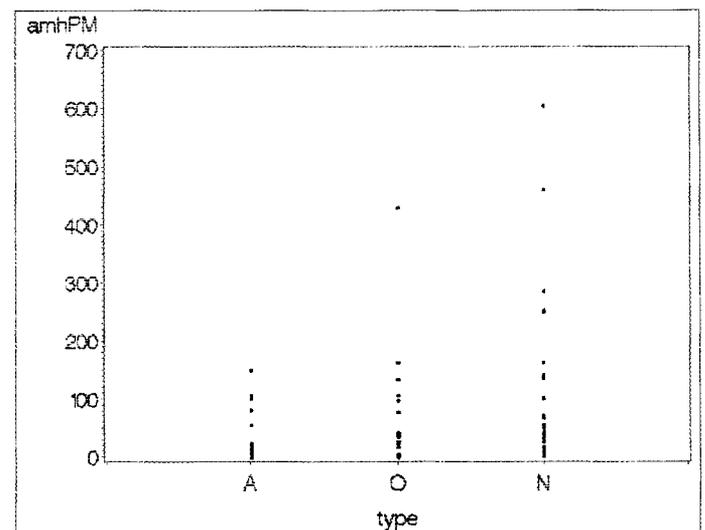
Dans les trois groupes de patients, les valeurs d'inhibine B et d'AMH dans le plasma séminal sont très dispersées (Figures 1 et 2). Chez les 67 patients présentant une *azoospermie*, les concentrations d'inhibine B dans le plasma séminal sont comprises entre 15 et 388 ng/l (moyenne :  $59,61 \pm 2,65$  ng/l) et les concentrations d'AMH entre 0,7 et 150 pmol/l (moyenne :  $13,12 \pm 31,94$  pmol/l) ; dans les *oligozoospermies*, les concentrations sont comprises entre 24 et 1000 ng/l (moyenne :  $417,5 \pm 386,9$  ng/l) et entre 0,7 et 430,20 pmol/l (moyenne :  $62,02 \pm 93,33$  pmol/l) respectivement. Chez les 47 patients à paramètres spermatiques normaux, les taux d'inhibine B (de 33 à 2673 ng/l, moyenne :  $714,36 \pm 522,66$ ) et d'AMH (de 0,7 à 605,31 pmol/l, moyenne :  $97,08 \pm 135,15$ ) sont plus élevés. Les moyennes de ces deux paramètres diffèrent très significativement entre les trois groupes ( $p < 0,001$ ).

L'AMH est indétectable dans le plasma séminal dans tous les cas d'azoospermie obstructive après



**Figure 1 : Distribution des concentrations d'inhibine B séminale (en ng/l) dans les trois groupes de patients : avec azoospermie, oligozoospermie, normospermie.**

**Les concentrations d'inhibine B sont significativement différentes dans les trois groupes ( $p < 0,001$ ).**



**Figure 2 : Distribution des concentrations d'AMH séminale (en pmol/l) dans les trois groupes de patients : azoospermie, oligozoospermie, normospermie.**

**Les concentrations d'AMH sont significativement différentes dans les trois groupes ( $p < 0,001$ ).**

vasectomie, confirmant une origine testiculaire. Dans un cas, deux dosages d'inhibine B et d'AMH ont été effectués après vasectomie ; lors du premier dosage, des concentrations détectables pour les deux paramètres (97 ng/l et 9,5 pmol/l respectivement) ont été observées

alors que quelques spermatozoïdes immobiles persistaient dans l'éjaculat. Lors du deuxième dosage, les concentrations d'inhibine B et d'AMH étaient toutes deux indétectables et aucun spermatozoïde n'a été observé.

Les 8 patients atteints du syndrome de Klinefelter présentaient tous un profil semblable : inhibine B sérique indétectable, concentrations séminales d'inhibine B et d'AMH basses (4 cas avec AMH indétectable).

## 2. Corrélations

Il existe une corrélation positive significative ( $p=0,005$ ) entre la concentration d'inhibine B dans le plasma séminal et la numération des spermatozoïdes dans le sperme (coefficient de corrélation : 0,334). Pour les oligozoospermies et azoospermies, il existe une corrélation négative entre le taux sérique de FSH et les concentrations séminales d'AMH (coefficient de corrélation de Pearson : -0,18,  $p=0,117$  non significative) et d'inhibine B (coefficient de corrélation de Pearson : -0,24,  $p=0,046$ ). Aucune différence significative concernant les concentrations séminales d'inhibine B et d'AMH en fonction de l'origine sécrétoire ou obstructive de l'azoospermie n'a pu être établie. En revanche, les taux moyens d'AMH diffèrent très significativement ( $p<0,001$ ) en fonction de l'indication de l'azoospermie : traitement stérilisant ; génétique : syndrome de Klinefelter et microdélétion du chromosome Y ; obstructive ; idiopathique (Tableau 3). Les taux moyens d'AMH sont de  $52,26 \pm 61,54$  pmol/l pour les patients ayant eu un traitement stérilisant, de  $11,97 \pm 23,96$  pmol/l dans les causes génétiques, de  $4,93 \pm 9,98$  pmol/l dans les azoospermies idiopathiques et de  $1,8 \pm 2,25$  pmol/l dans les azoospermies d'origine obstructive.

Nous avons évalué la corrélation entre concentration d'inhibine B séminale et numération dans le groupe des normospermies et des azoospermies à l'aide d'une courbe ROC (Figure 3). La valeur seuil de l'inhibine séminale la plus discriminante est de 150 ng/l, correspondant à une sensibilité de 92,5% et une spécificité de 87,3% (l'aire sous la courbe est de 0,963). Il n'existe pas de corrélation entre les concentrations moyennes d'inhibine B séminale et le volume testiculaire chez les patients présentant une azoospermie. La courbe ROC réalisée n'a aucune valeur discriminante (Figure 4).

## 3. Intérêt dans le cas des biopsies testiculaires

Vingt-six patients ont bénéficié d'une biopsie testiculaire dont 21 présentant une azoospermie non obstructive. Des spermatozoïdes ont été retrouvés lors de la biopsie testiculaire chez 11 patients ayant une azoospermie non obstructive (52,3%).

Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le résultat de la biopsie testiculaire et le taux d'inhibine B (moyenne :  $33,3 \pm 24,6$  ng/l pour les biopsies négatives versus  $45,7 \pm 54,7$  ng/l pour les biopsies positives) et d'AMH ( $4,52 \pm 4,7$  pmol/l et  $8,64 \pm 20,96$  pmol/l respectivement) dans le plasma séminal. En revanche, la moyenne de l'inhibine B sérique est plus élevée en cas de biopsie positive (moyenne :  $22,2 \pm 19,6$  ng/l pour les biopsies négatives versus  $66,25 \pm 58,8$  ng/l pour les biopsies positives,  $p=0,028$ ).

Les moyennes des concentrations séminales d'inhibine B et d'AMH pour les patients avec un résultat de biopsie négatif sont de 33,3 ng/l et 4,5 pmol/l respectivement et de 45,7 ng/l et 8,6 pmol/l pour les biopsies ayant permis de récupérer des spermatozoïdes.

La valeur prédictive de l'inhibine B séminale sur le résultat de la biopsie testiculaire dans les azoospermies non obstructives est représentée par la courbe ROC (Figure 5). L'aire sous la courbe pour cette population est de 0,63. La valeur seuil de l'inhibine B séminale la plus discriminante sur la positivité de la biopsie est de 30 ng/l (sensibilité 66,6% et spécificité 66,6%) : valeur discriminante très faible.

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la concentration d'AMH et le résultat de la biopsie testiculaire (la courbe ROC représentant la valeur prédictive de l'AMH sur le résultat de la biopsie testiculaire n'a pas de valeur discriminante) (Figure 6). En revanche, il existe une corrélation significative entre le taux sérique de FSH et le résultat de la biopsie testiculaire. La courbe ROC représentant la valeur prédictive de la FSH sur le résultat de la biopsie testiculaire a une meilleure valeur discriminante, la valeur seuil de FSH la plus discriminante est de 21,5 UI/l (sensibilité 100% et spécificité 55%) (Figure 7). La combinaison des deux marqueurs, FSH et inhibine B, n'est pas plus discriminante : pour les concentrations de FSH supérieures à 21,5 UI/l, toutes les biopsies sont négatives ; de plus, pour les concentrations inférieures à 21,5 UI/l, la valeur prédictive de l'inhibine B séminale n'est pas discriminante.

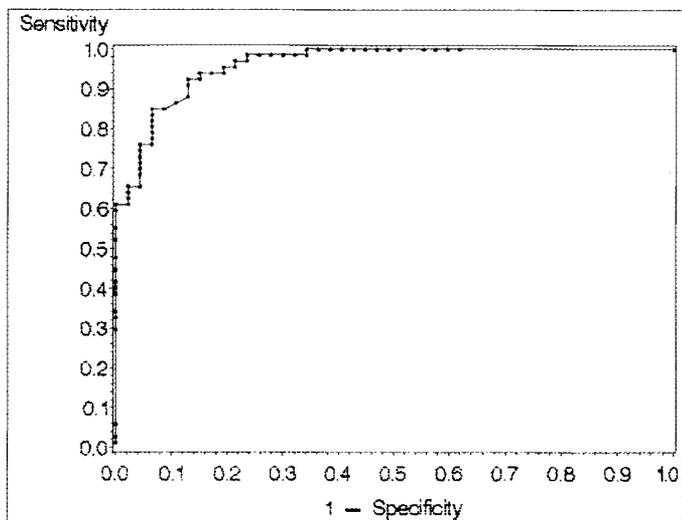
Nous avons également étudié le résultat de la biopsie en fonction du volume testiculaire chez les patients azoospermiques. On retrouve une biopsie positive chez 12 patients ayant un volume testiculaire normal versus 2 patients avec un volume inférieur à la normale. Des biopsies négatives sont retrouvées indépendamment du volume dans les deux populations.

## 4. Application pratique : intérêt dans le suivi d'un traitement antiviral

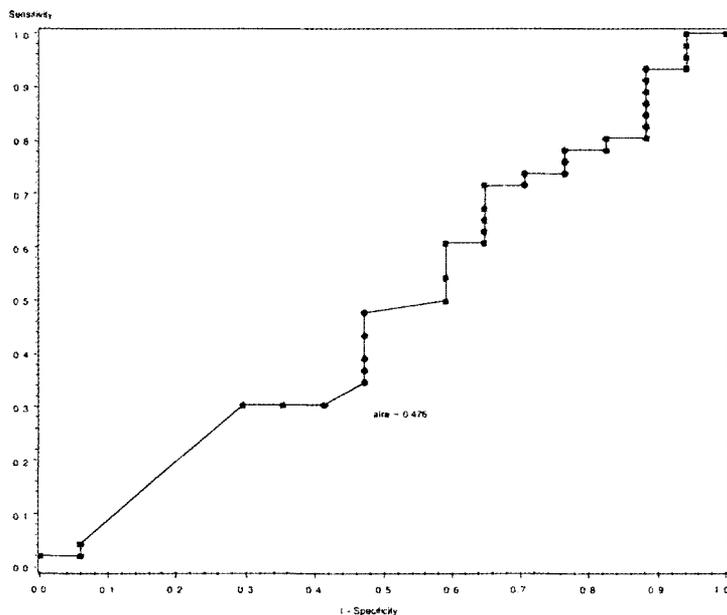
Nous avons évalués plusieurs paramètres - FSH sérique,

**Tableau 3 : Comparaison des moyennes des concentrations d'AMH selon l'indication de l'azoospermie. Il existe une différence significative ( $p < 0,001$ ).**

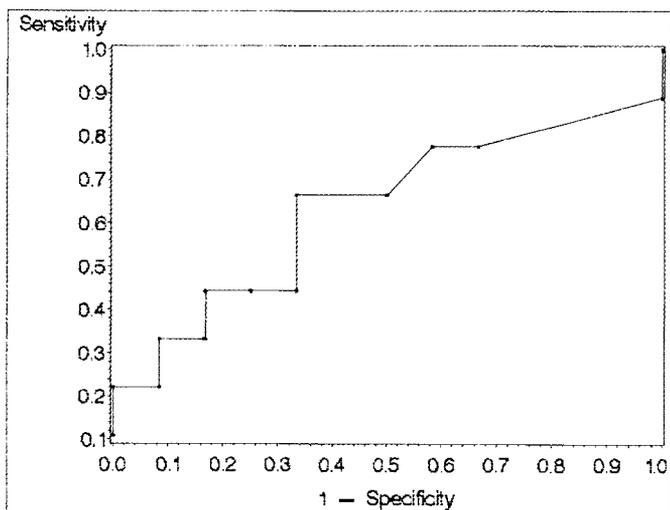
Cause de l'azoospermie	Nombre	Concentration moyenne AMH (en pmol/l)	Ecart - type
Traitement stérilisant	11	52,26	61,54
génétique	11	11,97	23,96
idiopathique	29	4,80	9,84
obstructive	16	1,82	2,25
Total	67	70,85	97,59



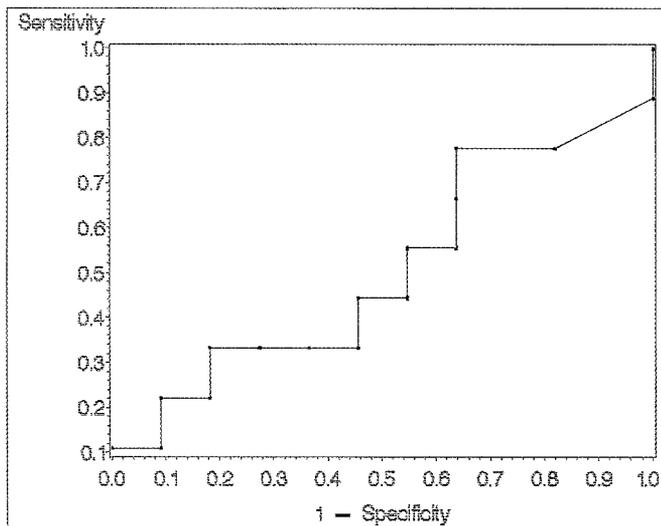
**Figure 3 : Courbe ROC représentant la valeur prédictive de l'inhibine B dans le plasma sérial sur l'azoospermie/normospermie. Courbe réalisée chez 67 patients azoospermiques et 47 normospermiques. L'aire sous la courbe est de 0,963. La valeur seuil de l'inhibine la plus discriminante est de 150 ng/l (sensibilité 92,5% et spécificité 87,3%).**



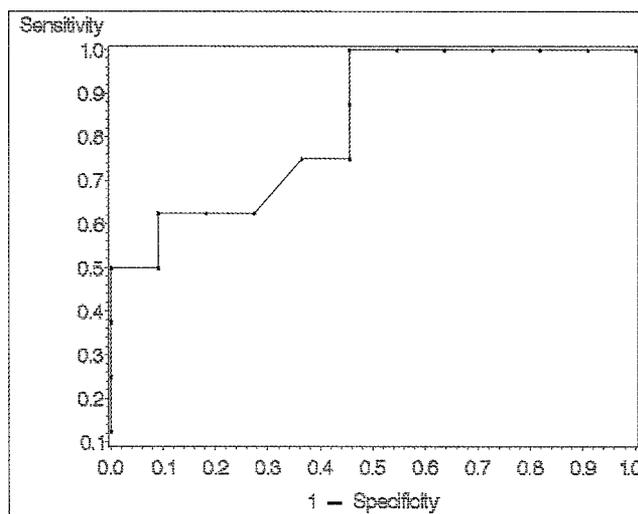
**Figure 4 : Courbe ROC volume testiculaire et inhibine B séminale dans les azoospermies. L'aire sous la courbe est de 0,476.**



**Figure 5 : Courbe ROC représentant la valeur prédictive de l'inhibine B séminale sur le résultat de la biopsie testiculaire. L'aire sous la courbe pour cette population est de 0,63. La valeur seuil de l'inhibine B séminale la plus discriminante sur la positivité de la biopsie est de 30 ng/l (sensibilité 66,6% et spécificité 66,6%).**



**Figure 6 : Courbe ROC représentant la valeur prédictive de L'AMH séminale sur le résultat de la biopsie testiculaire. L'aire sous la courbe pour cette population est de 0,51. La valeur seuil de l'AMH séminale la plus discriminante sur la positivité de la biopsie est de 1,8 pmol/l (sensibilité 77,8% et spécificité 36,4%).**



**Figure 7 : Courbe ROC représentant la valeur prédictive de la FSH plasmatique (en UI) sur le résultat de la biopsie testiculaire. L'aire sous la courbe pour cette population est de 0,83. La valeur seuil de la FSH plasmatique la plus discriminante sur la positivité de la biopsie est de 21,5 UI/l (sensibilité 100% et spécificité 55%).**

inhibine B sérique et séminale, AMH séminale, virémie, numération et mobilité des spermatozoïdes - chez un patient présentant une oligo-astheno-térazoospermie avec virémie positive pour l'hépatite C avant, pendant et après traitement antiviral par bithérapie (interféron, ribavirine).

Dès l'instauration du traitement, une baisse rapide de la charge virale dans le sang, puis dans le sperme a pu être obtenue avec une altération des paramètres spermatiques (numération et mobilité), une baisse de l'inhibine B (dans le sang et le plasma séminal), une baisse de l'AMH séminale et une augmentation de la FSH sérique. Après l'arrêt du traitement, la charge virale demeure négative et si tous les paramètres tendent à se normaliser, l'AMH dans le plasma séminal est l'un des premiers à retrouver la valeur d'origine (Tableau 4). Cette observation confirme la corrélation entre les concentrations d'inhibine B et d'AMH et la spermatogénèse.

#### IV. DISCUSSION

La possibilité d'utiliser des spermatozoïdes d'origine testiculaire en vue de réaliser une injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) a modifié la prise en charge des patients présentant une azoospermie. Dans 43% des cas d'azoospermies sécrétoires, de multiples biopsies testiculaires sont nécessaires afin de retrouver un nombre suffisant de

spermatozoïdes pour réaliser une ICSI [26]. Si l'ICSI est réalisée de façon synchrone avec la biopsie testiculaire, une coordination avec la stimulation ovarienne de la femme est nécessaire. Les biopsies testiculaires négatives ont des répercussions psychologiques et financières importantes. Afin de mieux évaluer les chances de retrouver des spermatozoïdes testiculaires, de nombreux marqueurs ont été proposés : volume testiculaire, taux sérique de FSH et de LH, analyse histologique du tissu testiculaire, mais seule la présence de spermatozoïdes lors de la biopsie préliminaire paraît avoir un réel pouvoir prédictif [26, 10]. Cependant l'absence de spermatozoïdes lors d'une unique biopsie n'implique pas une absence totale de spermatozoïde dans le testicule. De plus, les conséquences à long terme de biopsies testiculaires multiples demeurent encore inconnues. Il devient donc nécessaire de disposer de nouveaux marqueurs prédictifs non invasifs.

Quelques études ont été effectuées sur les concentrations d'AMH et d'inhibine B dans le sérum, mais il existe très peu de publications portant sur ces deux marqueurs dans le plasma séminal, probablement en raison de la plus grande difficulté de recueil, de stockage et de dosage dans le compartiment séminal.

Dans notre étude, nous avons mis en place et validé les dosages de l'AMH et d'Inhibine B dans le plasma séminal dans trois populations de patients : normospermiques, oligozoospermiques et azoospermiques. Nous

**Tableau 4 : Evolution de différents paramètres au cours du traitement antiviral d'un patient virémique pour le VHC (virus de l'Hépatite C).**

	<b>Sperme : Numération + mobilité (type a)</b>	<b>FSH UI/l</b>	<b>Inhibine sérique ng/l</b>	<b>Inhibine séminal ng/l</b>	<b>AMH séminal pmol/l</b>	<b>Charge virale VHC</b>
Avant le traitement	10 x10 <sup>6</sup> spz/ml, 20%	8	101	358	3,3	8,3 x 10 <sup>4</sup> UI/ml
Pendant le traitement	2 x10 <sup>6</sup> spz/ml, 5%	10	66	44	<1,75 : indéetectable	1,6 x 10 <sup>2</sup> UI/ml
Après le traitement	17 x10 <sup>6</sup> spz/ml, 45%	7,7	68	58	3,1	<100 copies/ml

proposons ici en premier lieu des normes pour les concentrations séminales d'inhibine B et d'AMH dans les trois groupes étudiés. Dans une étude préliminaire, nous avons également évalué le pouvoir prédictif de ces deux marqueurs sur le résultat de la biopsie testiculaire dans les azoospermies non obstructives.

Les valeurs que nous observons pour le dosage de l'AMH concordent avec celles des deux publications antérieures, que les paramètres spermatiques soient normaux ou non [12, 13]. En revanche, en cas de normospermie, nous notons des valeurs d'inhibine B dans le plasma séminal plus dispersées et moins élevées que celles de l'unique étude publiée [9], ceci pouvant être attribué en partie au faible effectif de cette dernière (10 cas de patients avec une normospermie étudiés).

La grande dispersion des valeurs séminales d'inhibine B et d'AMH que nous observons dans les trois populations rend difficile l'établissement de seuils de décision. Cependant, les concentrations d'inhibine B et d'AMH sont significativement plus élevées lorsque les paramètres spermatiques sont normaux par rapport aux oligozoospermies et aux azoospermies, ce qui confirme l'hypothèse d'une corrélation avec la spermatogenèse. Il existe en effet une corrélation significative entre les concentrations d'inhibine B dans le plasma séminal et la numération des spermatozoïdes dans le sperme (coefficient de corrélation : 0,334). En revanche, cette corrélation n'a pas été démontrée pour l'AMH. La courbe ROC de l'inhibine B dans le plasma séminal en fonction des normospermies et des azoospermies avec une aire sous la courbe de 0,963 confirme également l'existence d'une corrélation avec la spermatogenèse. Avec une valeur seuil de 150 ng/l, cette courbe montre la fonction discriminante de l'inhibine B séminale entre les deux populations de patients

azoospermiques et normospermiques.

D'autre part, de faibles concentrations d'AMH semblent être le reflet d'une immaturité des cellules de Sertoli. En effet, les concentrations d'AMH séminales dans les cellules de Sertoli matures sont plus élevées que dans le sérum et dans le plasma séminal issu de cellules de Sertoli immatures [13]. La concentration d'AMH dans le plasma séminal pourrait être un bon marqueur de la spermatogenèse mais également du degré de développement des cellules de Sertoli.

Les publications traitant du rôle de l'inhibine B sérique comme facteur prédictif du succès de la biopsie testiculaire sont contradictoires. L'une montre que l'inhibine B est un facteur prédictif satisfaisant [4], d'autres considèrent que l'inhibine B sérique ne représente pas un marqueur suffisamment discriminant pour évaluer les chances de retrouver des spermatozoïdes testiculaires [8, 14, 29]. En revanche, une publication récente montre la valeur prédictive de l'inhibine B dans le plasma séminal sur le résultat de la biopsie testiculaire chez 62 patients présentant une azoospermie non obstructive [21]. Dans notre étude, le pouvoir prédictif de l'inhibine B séminale a été évalué à l'aide de la courbe ROC : l'aire sous la courbe est de 0,63 ; cette valeur discriminante très faible peut être expliquée par le faible effectif de patients ayant eu recours à la biopsie testiculaire.

En revanche, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence de corrélations entre les taux de ces marqueurs séminaux et le taux de FSH sérique.

Par ailleurs, contrairement à d'autres publications [26, 10], nous avons mis en évidence le pouvoir prédictif de la FSH sérique sur le résultat de la biopsie testiculaire.

## V. CONCLUSION

**Notre étude préliminaire confirme qu'il existe une corrélation entre les concentrations d'inhibine B et d'AMH dans le plasma séminal et la spermatogenèse. L'intérêt de ces deux marqueurs comme facteur prédictif de la biopsie testiculaire dans les cas d'azoospermie non obstructive reste limité. En effet, cette étude montre que ni l'AMH ni l'inhibine B, seule ou associée à la FSH, ne permettent de prédire le succès de la biopsie testiculaire. Cependant, le faible effectif de patients ayant eu recours à la biopsie testiculaire constitue la principale limite de cette étude.**

**Ces marqueurs sont encore peu utilisés en pratique. En effet, le principal inconvénient de ces dosages reste leur technique longue, délicate et entièrement manuelle. Une nouvelle technique de dosage de l'AMH, sensible et spécifique, a été développée [1]. Il s'agit, de même que le kit Immunotech préexistant, d'un dosage immunoenzymatique, mais utilisant deux anticorps monoclonaux différents. Cette nouvelle méthode de dosage n'est pas encore commercialisée, mais a déjà montré des résultats prometteurs : la concentration d'AMH sérique chez les hommes infertiles serait significativement plus faible que chez les hommes fertiles.**

## REFERENCES

1. AL-QAHTANI A., MUTTUKRIHNA S., APPASAMY M. et al. : Development of sensitive enzyme immunoassay for anti-Müllerian hormone and the evaluation of potential clinical applications in males and females. *Clin. Endocrinol.*, 2005, 63 : 267-273.
2. AMER M., ABD ELNASSER T., EL HAGGAR S., MOSTAFA T., ABDEL-MALAK G., ZOHDY W. : May – Grunwald - Giemsa stain for detection of spermatogenic cells in the ejaculate : a simple predictive parameter for successful testicular sperm retrieval. *Hum. Reprod.*, 2001, 16 : 1427-1432.
3. ANDERSON R.A. : Clinical studies : inhibin in the adult male. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2001, 180 : 109-116.
4. BALLESCA J.L., BALLASCH J., CALAFELL J.M., MARTINEZ DE OSABA M.J., ASCASO C., VANRELL J. : Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 1734-1738.
5. BOHRING C., SCHROEDER-PRINTZEN I., WEIDNER W., KRAUSE W. : Serum levels of inhibin B follicle-stimulating hormone may predict successful sperm retrieval in men with azoospermia who are undergoing testicular sperm extraction. *Fertil. Steril.*, 2002, 78 : 1195-1198.
6. BRUGO-OLMEDO S., DE VINCENZI S., CALAMERA J.C., URRUTIA F., NODAR F., ACOSTA A. : Serum inhibin B may be a reliable marker of testicular spermatozoa in patients with non-obstructive azoospermia. *Fertil. Steril.*, 2001, 76 : 1124-1129.
7. 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 area of intracytoplasmic sperm

- injection for non-obstructive azoospermia ? *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 2176-2179.
8. DEFFIEUX X., ANTOINE J.M. : Inhibines, activines et hormone anti müllérienne : structure, signalisation, rôles et valeur prédictive en médecine de la reproduction. *Gyn. Obst. Fertil.*, 2003, 31 : 900-911.
9. EL GAREM Y.F., EL ARINI A.F., EL BEHEIRY A.H., ABOU ZEID S.A., COMHAIRE F.H. : Possible relationship between seminal plasma Inhibine B and spermatogenesis in patients with azoospermia. *J. Androl.*, 2002, 23 : 825-829.
10. EZEH U.I.O., TAUB N.A., MOORE H.D.M., COOKE I.D. : Establishment of predictive variables associated with testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 1005-1012.
11. FENICHEL P., POINTIS G. : Nouveaux marqueurs séminaux. *Reprod. Hum. Horm.*, 2000, 13 : 511-515.
12. FENICHEL P., REY R., POGGIOLI S., DONZEAU M., CHEVALLIER D., POINTIS G. : Anti-Müllerian hormone as a marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 2020-2024.
13. FUJISAWA M., YAMASAKI T., OKADA H., KAMIDONO S. : The significance of anti-Müllerian hormone concentration in plasma seminal for spermatogenesis. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 968-970.
14. HALDER A., FAUZDAR A.N., KUMAR A. : Serum inhibin B and follicle-stimulation hormone levels as markers in the evaluation of azoospermic men : a comparison. *Andrologia*, 2005, 37 : 173-179.
15. KUMANOV P., NANDIPATI K.C., TOMOVA A., ROBEVA R., AGARWAL A. : Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications. *Reprod. BioMed. Online*, 2005, 10 : 786-796.
16. LUISI S., FLORIO P., REIS F.M., PETRAGLIA F. : Inhibins in female and male reproductive physiology : role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Hum. Reprod.*, 2005, 11 : 123-135.
17. MARCHETTI C., HAMDANE M., MAYO V. et al. : Immunolocalization of inhibin and activin alpha and betaB subunit and expression of corresponding messenger RNAs in the human adult testis. *Biol. Reprod.*, 2003, 68 : 230-235.
18. MARTIN-DU-PAN R.C., BISCHOF P. : Increased follicle stimulating hormone in infertile men. Is increased plasma FSH always due to damaged germinal epithelium ? *Hum. Reprod.*, 1995, 10 : 1940-1945.
19. MEACHEM S.J., NIESCHLAG E., SIMONI M. : Inhibin B in male reproduction : pathophysiology and clinical relevance. *Eur. J. Endocrinol.*, 2001, 145 : 561-571.
20. MULHALL J.P., BURGESS C.M., CUNNINGHAM D., CARSON R., HARRIS D., OATES R.D. : Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with non-obstructive azoospermia: prevalence and predictive factors. *Urology*, 1997, 49 : 91-96.
21. NAGATA Y., FUJITA K., BANZAI J., KOJIMA Y., SUZUKI M., TANAKA K. : Seminal plasma inhibins-B level is a useful predictor of the success of conventional testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia. *J. Obst. Gynaecol.*, 2005, 31 : 384-388.
22. PATEL P.J., PAREEK S.S. : Scrotal ultrasound in male infertility. *Eur. Urol.*, 1989, 16 : 423-425.
23. REY R. : Assessment of seminiferous tubule function (anti-Müllerian hormone). *Ballière's Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, 14 : 399-408.
24. SEO J.T., KO W.J. : Predictive factors of successful testicular

- sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients. *Int. J. Androl.*, 2001, 24 : 306-310.
25. TAKAHIRA H., SAKATOKU J., FUJII M. et al. : Significance of testicular size measurement in andrology. A new orchidometer and its clinical application. *Fertil. Steril.*, 1983, 39 : 836-840.
26. TOURNAYE H., VERHEYEN G., UBALDI F. et al. : Are there any predictive factors successful testicular sperm recovery in azoospermic patients ? *Hum. Reprod.*, 1997, 12 : 80-86.
27. TSUJIMURAA., MATSUMIYA K., MIYAGAWA Y. et al. : Prediction of successful outcome of microdissection testicular sperm extraction in men with idiopathic nonobstructive azoospermia. *J. Urol.*, 2004, 172 : 1944-1947.
28. VALETTE J., GRIMAUD J.A., LANSAC J., COGNAT M. : Tentative d'interprétation standardisée de l'histologie testiculaire et de la fertilité masculine. *Gynécologie*, 1976, 27 : 219-224.
29. VERNAEVE V., TOURNAYE H., SCHIETTECATTE J., VERHEYEN G., VAN STEIRTEGHEM A., DEVROEY P. : Serum inhibin B cannot predict testicular sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 971-976.
30. YALTI S., GURBUZ B., FICIO C. : Serum levels of inhibin B in men and their relationship with gonadal hormones, testicular biopsy results and sperm parameters. *J. Obst. Gynaecol.*, 2002, 22 : 649-654.

ng/l, AMH:  $97.08 \pm 135.15$  pmol/l) than in oligospermic men (inhibin B:  $417.5 \pm 386.9$  ng/l, AMH:  $62.02 \pm 93.33$  pmol/l) and azoospermic men ( $59.61 \pm 2.65$  ng/l et  $13.12 \pm 31.94$  pmol/l, respectively) ( $p < 0.001$ ). A significant correlation ( $p = 0.0054$ ) was observed between seminal inhibin B concentration and sperm production. Testicular biopsy allowed sperm retrieval in 11 out of 21 patients (52.3%). The predictive value of seminal inhibin B was analyzed using receiver operating characteristics (ROC) curve analysis. The best discriminating inhibin B concentration was 30 ng/l with an area under the curve (AUC) of 0.63.

**Conclusion:** This study confirms the correlation between seminal inhibin B and AMH concentrations and spermatogenesis. However, the significance of these two markers as predictors of the presence of testicular sperm in men with non-obstructive azoospermia is limited. This analysis shows that AMH and inhibin B, either alone or in combination with serum FSH, fail to predict the presence of sperm in men with non-obstructive azoospermia undergoing testicular sperm extraction.

**Key words:** *inhibin B, AMH, seminal markers, nonobstructive azoospermia, testicular biopsy*

Manuscrit reçu : mars 2006 ; accepté avril 2006.

## ABSTRACT

### The significance of inhibin B and AMH in seminal plasma: a preliminary study

Emma DUVILLA, Isabelle AKNIN-SEIFER, Béatrice TROMBERT-PAVIOT, Anne GENTIL-PERRET, Jacques TOSTAIN, Yves MENEZO, Jacques CHOUTEAU, Jean-Bernard LAMOULLIATE, Rachel LEVY

**Objectives:** The aim of this study was to establish reference values for seminal inhibin B and AMH concentrations in patients with normal and abnormal sperm parameters. Preliminary analysis was performed to evaluate the predictive value of these markers for retrieving testicular sperm in non-obstructive azoospermic men.

**Methods:** Seminal inhibin B and AMH concentrations were assayed by an enzyme-linked immunoassay in three groups of men: 47 patients with normal sperm parameters, 28 oligospermic men and 68 patients with azoospermia.

**Results:** Inhibin B and AMH concentrations varied considerably in the three groups, but were significantly higher in normospermic men (inhibin B:  $714.36 \pm 522.66$