

ETUDE CYTOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE EN VUE DU DIAGNOSTIC DES HYPOFERTILES

MOKADDEM H., KHELILI K. & KECHRID Z.

Département de Biochimie - Université Badji-Mokhtar - Annaba

Résumé

Ce travail postulant pour l'étude de l'hypofertilité masculine, se répartit en deux études indissociables dont l'objectif est d'en affirmer l'étiologie ou du moins orienter la recherche étiologique. La première vise l'exploration cytologique se basant sur l'étude du spermogramme.

La deuxième tente à l'analyse biochimique du plasma séminal et consiste à doser le fructose, le zinc et l' α -glucosidase qui, sont les bio-indicateurs respectivement de la fonction des vésicules séminales, la prostate et l'épididyme. Les informations fournies par les dosages permettant la mise en évidence de 3 grands types de perturbations : Premièrement, les pathologies, endocriniennes : Exp. : le syndrome de Klinefelter (47, xxy).

Deuxièmement, les inflammations des glandes annexes : surtout dans les cas des prostatites.

Troisièmement, Les occlusions des conduits excréteurs : en effet, l' α -glucosidase a permis de différencier les azoospermies excrétoires et sécrétoires.

Mots clés : hypofertilité masculine ; spermogramme ; plasma séminal ; fructose ; zinc ; α -glucosidase

المخلص

تتمثل هذه الدراسة في معرفة العلاقة الموجودة بين الخصائص البيولوجية و البيوكيميائية و بعض حالات العقم الذكري و هذا لغرض توجيه الدراسات التشخيصية للسائل المنوي.

يتمثل الجزء الأول من هذه الدراسة في معرفة بعض الخصائص الأساسية (بيولوجية و فيزيوكيميائية) للسائل المنوي. أما الجزء الثاني فيتمثل في دراسة بعض المؤشرات البيوكيميائية (الفركتوز، الزنك و ألفا-جليكوزيداز) التي تعكس وظيفة الغدد المساعدة على مستوى الجهاز التناسلي الذكري (الحويصلات المنوية، البرستات و البريخ).

لقد أوضحت هذه الدراسة إمكانية وجود ثلاثة أنواع من الاضطرابات المرتبطة بالجهاز التناسلي.

- على مستوى الكروموزومات (Syndrome de klinefelter (47,XXY)

- التهابات على مستوى الغدد المساعدة، خاصة في حالة أمراض غدة البروستات.

- انسداد على مستوى القنوات الناقلة حيث تم التعرف على نوعين من حالة Azoospermie الإفرازي و الإخراجي بفضل أنزيم ألفا-جليكوزيداز.

1. INTRODUCTION

L'infertilité masculine, maladie "tabou" traduisant l'inaptitude de l'homme à concevoir est souvent mal vécue au sein du couple, engendrant ainsi un immense déséquilibre dans son harmonie sexuelle. Cependant, la stérilité, ne peut être affirmée qu'à la fin de la vie reproductive. Ainsi, 60% des couples qui consultent après 6 mois d'essais infructueux auront une grossesse sans traitement [1] ; c'est pourquoi, le diagnostic d'infertilité ne doit être posé qu'après 1 an à 18 mois de rapports sexuels réguliers [2].

Une infertilité est dite primaire lorsqu'il n'y a jamais eu de grossesse au préalable, secondaire s'il y a eu grossesse, même si celle-ci s'est achevée par un avortement ou une grossesse extra-utérine [1][3]. Plusieurs études internationales sur la stérilité conjugale admettent que la femme est en cause pour 1 / 3 des cas, l'homme pour le 1 / 5, les deux dans 1 / 4 et aucune cause n'est relevée dans 1 / 5 des cas [4]. Ainsi la stérilité pose un réel problème de santé publique par ses conséquences médicales, sociales et démographiques. De ce fait, d'énormes progrès ont

été effectués et de nombreuses recherches sont en cours pour mieux comprendre les phénomènes de la reproduction et donner ainsi de nouvelles perspectives quand aux explorations et traitements de la stérilité.

Pour pouvoir classer, diagnostiquer et localiser l'origine de l'infertilité masculine, l'exploration clinique (précédée par un interrogatoire pour connaître les antécédents médicaux et l'état civil du patient), biologique (spermogramme) ainsi que biochimique doivent aller de paire [1]. Le spermogramme est l'examen clé de la fertilité masculine qui consiste à établir les paramètres physico-chimiques, la concentration, la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes [5] dont l'objectif est de chiffrer les possibilités fécondantes du sperme. Il est informatif lorsque interprété dans le plus large contexte de l'histoire du patient et de son dossier clinique.

En effet, dans notre étude, les spermogrammes des patients ont révélé 3 pathologies spermatiques : l'asthénospermie, l'oligo-asthénospermie et l'azoospermie.

Actuellement, la biochimie séminale clinique n'étudie que les variations de sécrétions du tractus génital. Elle fournit néanmoins d'importants renseignements sur certaines causes d'infécondité masculine. Ceci est confirmé par nos dosages du fructose, du zinc et d' α -glucosidase. Ils ont permis d'établir une sorte de cartographie biochimique, anatomique et fonctionnelle de l'appareil masculin et pourront compléter utilement l'histologie et la bactériologie.

2. MATERIEL ET METHODES

MATERIEL BIOLOGIQUE UTILISE

Nous avons utilisé comme matériel biologique, le volume spermatique (2-5 ml / éjaculat) recueilli des 25 hommes présentant une moyenne d'âge de 35 ans, orientés vers le Laboratoire de Cytogénétique et de la Reproduction de l'hôpital Ibn-Rochd (Annaba) pour l'analyse de leurs spermatozoïdes. Ces sujets ont bénéficié de l'analyse cytologique et biochimique de leur sperme.

CONDITIONS DU RECUEILLEMENT DU SPERME

Le patient reçoit un certain nombre d'informations et d'instructions pour assurer le bon déroulement et la précision de l'analyse par la suite :

- une abstinence sexuelle de 3 jours.

- le recueil du sperme s'effectue par masturbation.

PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Le sperme recueilli (2-5 ml/ éjaculat) est incubé à 37°C pendant 30 mn pour assurer sa liquéfaction. Une partie du sperme (quelques gouttes) sert à l'étude du spermogramme. L'autre partie, est centrifugée à 2000g pendant 20 mn : le plasma séminal recueilli est réparti en aliquotes (0,5 ml chacune) et congelé à -20°C pour les utiliser ultérieurement dans les différents dosages biochimiques : (fructose, zinc et α -glucosidase).

le fructose est dosé par la méthode de Karmoven et Malm, [6] à une longueur d'onde de 470 nm, (valeur de référence ≥ 13 mmol / éjaculation).

le zinc est dosé selon la méthode de Rodier [7] à une longueur d'onde de 650 nm, (valeur de référence = 90 - 250 μ g / ml).

l' α glucosidase est dosée selon la méthode de Cooper α [8] à une longueur d'onde de 405 nm (valeur de référence > 20 μ M / ml).

ANALYSE STATISTIQUE

Les analyses statistiques ont été réalisées par le test de Bartlett.

3. RESULTATS

EXPLORATION CYTOLOGIQUE

Les spermogrammes des 25 sujets révèlent :

- 5 cas normaux (témoins) qui représentent un pourcentage de 20% dont 2 cas sont hypospermiques.
- Les 20 cas pathologiques sont répartis par ordre de fréquence décroissante :
 - . 8 cas asthénospermiques (32%), dont 5 présentent une asthénospermie sévère.
 - . 7 cas oligo-asthénospermiques (27%), dont 2 présentent une oligo-asthénospermie sévère.
 - . 5 cas azoospermiques (20%) du nombre total dont un est hypospermique.

EXPLORATION BIOCHIMIQUE

Nous allons étudier la distribution des fréquences et la signification des taux des 3 paramètres propres à chaque pathologie :

1- La normospermie

Tableau 1 : Résultats de l'étude biochimique des cas normaux

Marqueurs biochimiques	Nombre de Cas 2	2 (a)	1(b)
Fructose (mmoles /éjaculât)	34 et 43,62 *	8,32 et 9,13 **	1,18 ***
Zinc (µg /ml)	228 et 234 *	215 et 250 *	248 *
α glucosidase (µmoles /ml)	25 et 41 *	25,50 et 26,50 *	21 *

2- L'asthénospermie :

Tableau 2 : Résultats de l'exploration biochimique du plasma séminal chez les cas asthénospermiques

Marqueurs Biochimiques	Nombre de cas 4 (a)	1 (b)	1(c)	2 (d)
Fructose (mmoles/éjaculât)	[16,23-38,96] *	05,48 **	08,93 **	46,27 et 50,33 *
Zinc (µg /ml)	[134-220] *	44 **	244 *	238 et 248 *
α glucosidase (µmoles /ml)	[22,50-27] *	17,50 **	21,50 *	16,50 et 17,50 **

3-L'oligo-asthénospermie :

Tableau 3 : Résultats de l'exploration biochimique du plasma séminal chez les cas oligo-asthénospermiques.

Marqueurs Biochimiques	Nombre de cas 2 (a)	1 (b)	1(c)	3 (d)
Fructose (mmoles/éjaculât)	16,64 et 59,25 *	77,92 ☼	30,44 *	[20,60 - 56,3] *
Zinc (µg /ml)	72 et 74 **	96 *	242 *	[116 - 230] *
α glucosidase (µmoles /ml)	24 et 27 *	24 *	17,50 **	[21,50 - 24] *

4-L'azoospermie :

Tableau 4 : Résultats de l'étude biochimique des cas azoospermiques.

Marqueurs biochimiques	Nombre de cas 2 (a)	2 (b)	1(c)
Fructose (mmoles/éjaculat)	17,76 et 32,47 *	20,69 et 27,40 *	05.83 **
Zinc (µg /ml)	128 et 153 *	282 et 298 *	383 ☼
α glucosidase (µmoles /ml)	22 et 58,50 *	16,50 et 18,50 **	14,50 **

- * : Normal
- ** : Diminué
- *** : Effondré
- ☼ : Elevé

4. DISCUSSION

EXPLORATION CYTOLOGIQUE

L'examen physique révèle trois types de pathologies qui sont associées ou non à une agglutination, une leucospermie, une viscosité élevée ou à une hypospermie.

La présence de la leucospermie peut témoigner d'un phénomène infectieux sévère, se traduisant par une couleur jaunâtre et une odeur fétide du sperme, elle peut entraîner une azoospermie réversible. Comme elle peut témoigner d'un phénomène inflammatoire (comme une lithiase prostatique) engendrant des roubles et une chute de la mobilité, ce qui explique éventuellement la présence de certains cas d'asthénospermie.

- L'hypospermie (un volume < 2ml) est due soit à :
- une altération de la fonction sécrétoire d'une ou de deux glandes annexes.
 - un obstacle à la migration spermatique.
 - une agénésie de glande.

EXPLORATION BIOCHIMIQUE

1- La normospermie

- (a) Deux cas présentant des taux de fructose diminués, cette diminution est due à une hypospermie dont la cause est une éjaculation incomplète.
- (b) un cas présente un taux du fructose effondré (1,18 mmol/éjaculation) dû à une occlusion du col des vésicules séminales [9].

2- L'asthénospermie :

(a) Les 4 cas normaux pour les 3 paramètres biochimiques, leur asthénospermie est due à :

la viscosité très élevée du sperme due à des troubles de la liquéfaction pour un cas [10].

La présence leucocytaire (associée à l'agglutination ou à la présence de microorganismes) pour 2 cas.

L'anomalie des structures flagellaires de l'axonème ou des structures périaxonémales avec absence leucocytaire et d'agglutination pour un cas [11][12].

(b) Deux cas présentent une diminution des 3 paramètres due à une hypoandrogénie du syndrome de Klinefelter (47, xxy), lésions testiculaires ou un hypogonadisme primaire [13].

(c) Un cas présente un taux de fructose diminué du à une vésiculite inflammatoire ou infectieuse provoquant une chute de la mobilité [9].

(d) L'asthénospermie des deux cas est la conséquence d'une diminution du taux de l'α-glucosidase due à une obstruction épидидymaire ou au niveau du déférent [14].

2- l'oligo-asthénospermie

(a) Deux cas présentent une diminution au niveau du taux du zinc avec la présence d'une polynucléose pour un cas, sur le plan étiologique, cette diminution peut témoigner d'une prostatite [13].

Le volume spermatique des 2 cas est normal, ce qui revient à dire qu'indépendamment du volume de l'éjaculat, il pourrait y avoir une atteinte prostatique [3]. La prostatite est la cause de la diminution du taux du zinc entraînant une chute de la mobilité des spermatozoïdes et de ce fait, une baisse de la fécondité spontanée chez ces sujets. Le zinc est le seul marqueur séminal prostatique qui a été spécifiquement étudié pour son rapport avec la

mobilité spermatique ($p < 0,05^*$) [15][16][17][18][19].

(b) Un cas où le taux du fructose est élevé, ceci s'explique que la personne a un problème de diabète sucré car la synthèse du fructose se fait à partir du glucose sanguin [5][9].

(c) Un cas où le taux de l' α -glucosidase est diminué du à une obstruction au niveau de l'épididyme ou du déférent.

(d) Trois cas sont revenus normaux pour les 3 paramètres. L'oligo-asthénospermie est due à une inflammation ou à une infection accompagnée ou non de leucospermie

3- L'azoospermie

(a) Deux cas affichent des résultats normaux pour les trois paramètres avec présence de cellules rondes, ceci peut témoigner de l'origine sécrétoire de l'azoospermie due à l'altération de la spermatogenèse c'est à dire une azoospermie due à l'arrêt de la maturation du sperme n'influant pas sur les taux des 3 paramètres, exceptionnellement l' α -glucosidase [8][20].

Cette azoospermie peut être confirmée si le dosage plasmatique de FSH donne un taux augmenté [9][21].

(b) Les deux cas présentant seulement une diminution au niveau de l' α -glucosidase, cette azoospermie est en faveur d'une cause obstructive au niveau de l'épididyme ou du déférent, ce qui nécessite une anastomose épидидymo-déférentielle.

Ce remède peut être vérifié par le dosage de l' α -glucosidase ou de la carnitine pour s'assurer de la récupération de la physiologie épидидymaire [8][22].

(c) Le cas ayant un volume réduit (1,25ml), présente des taux diminués de fructose et d' α -glucosidase, par contre un taux prostatique (zinc) élevé.

Cette azoospermie est obstructive, due à une agénésie vésiculo-déférentielle et/ou l'obstruction des canaux, éjaculateurs avec une participation prédominante de la prostate [22][23].

5. CONCLUSION

L'exploration cytologique du sperme a permis de déterminer la distribution et la fréquence des pathologies spermatiques. Ces dernières révélées par l'examen du spermogramme, expliquant la perte du pouvoir fécondant du sperme. Certes la valeur de cet examen est absolue en cas d'azoospermie mais elle est « relative » en cas d'asthénospermie et d'oligo-asthénospermie.

L'exploration biochimique du plasma séminal réalisée nous a fourni d'importants renseignements sur certaines causes d'infécondités masculines : La

[14] Cooper T.G., Yeunz C.H., Nashand J. et Nieschlag E. (1988). Epididymal markers in human infertility. *Journal of Andrology* 9 : 91-101.

réduction des taux des marqueurs vésiculaires (fructose) et épидидymaire (α -glucosidase) ($p < 0,05$) permet le diagnostic et la localisation des occlusions sur le tractus génital. En effet, l' α -glucosidase différencie les azoospermies excrétoires et sécrétoires.

Excrétoires : conduits bouchés ou absents.

Sécrétoires : non fonctionnement des testicules.

Dans le cas de prostatites, la biochimie spermatique aide vraiment au diagnostic, une diminution de la sécrétion prostatique (zinc), révèle une inflammation souvent associée à une faible mobilité des spermatozoïdes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Herlicoviez M. et Herlicoviez D. (1995). Exploration d'un couple infertile. *Feuillets de biologie*. Vol. XXXVI – N°= 203.
- [2] Schwartz (1981). Importance de la durée d'infécondité dans l'appréciation de la fertilité d'un couple. *Pop. Studies*, 36 : 237 – 260.
- [3] Alexandre C. (1981). Stérilité masculine. *Encycl. Med.chir.gynécologie* : 74 – 103.
- [4] Patricot M.C. et Revol A. (1994). Physiologie du testicule et exploration de la stérilité masculine. *Spectra Biologie* N°= 94 / 4 Août – Septembre.
- [5] Girod C. et Czyba J.C. (1977). Biologie de la reproduction. Simep Eds. Villeurbanne – France, 107 – 115.
- [6] Karmoven M.J. et Malm M. (1955). Colorimetric determination of fructose with indol. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 7 : 305 – 307.
- [7] Rodier J. ; Geoffrey C.H. et Vemeasy J. (1975). L'analyse de l'eau. Tome II. PP : 184 – 189.
- [8] Cooper T.G., Yeunz CH, Nashand J. et Nieschlag E. (1990). Improvement in the assessment of human cpididymal fuction by the use of inhibitors in the assay of α - glucosidase in seminal plasma. *Int. J. of Androl.* 13 : 297 – 305.
- [9] Cohen-Bacrie P. (1993). Exploration biochimique du sperme humain. *Contracept. Fertil. Sex.* Vol. 21, N°12 : 891 – 892.
- [10] OMS (1993). Manuel de laboratoire de l'OMS; analyse du sperme humain et de l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical. Eds. I.N.S.E.R.M, p. 120.
- [11] Escalier D. et David G. (1984). Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum, axonemal and periaxonemal anomalies. *Biol. Cel.*, 50 : 37 – 52.
- [12] Zamboni L. (1992). Sperm structure and its relevance to infertility. *Arch. Path. Lab. Med.* : 116 – 325.
- [13] Metais P. et Agneray J. (1983). Biochimie clinique. 3 SIMEP : 363 – 370.
- [15] Caldamone A., Freytag M. et Cockett A. (1979). Seminal zinc and mal infertility. *Urology* 13 : 280 – 281.

- [16] Carpin A., Sisci D., Aquila S., Salerno M., Siciliano L., Sessa M. Ando S. (1994). Adnexal gland secretion markers in unexplained asthenozoospermia. *Archives of andrology* 32: 37 - 43.
- [17] Carreras A., Mendoza C. (1990). Zinc levels in seminal plasma of fertile and infertile men. *Andrologia* 22: 279 - 281.
- [18] Rizzo M., Leiva S. et Astudillo J. (1992). Effet of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction. *Int. J. Androl* 15: 229 - 237.
- [19] Skandhan K. P., Skandhan S., Mehta Y. B. (1978). Semen electrolytes in normal and infertile subjects. II : Zinc, *experientia* 34 : 1476 - 1477.
- [20] Soufrier J. C. (1983). L'exploration biochimique du sperme humain. *Rev. Prat.*, 57 : 3141 - 3147.
- [21] Soufrier J. C., Zerman- Joly E., Viellefond A., Weber P. (1988). Azoospermies à FSH plasmatique normal et carnitine séminale non abaissée: une double signification, implications diagnostiques et thérapeutiques. *Reprod. Nutr. Develop.*, 28 : 1363 - 1374.
- [22] Delafontaine (1988). Infécondité masculine - explorations et traitements. Searle Eds. Paris : 127.
- [23] Guerin J. F., Benali H., Cottinet D. et Rollet J. (1990). Seminal glycosidase activity as a marker of epididymal pathology in non-azoospermic men consulting for infertility. *Journal of andrology* 11: 240 - 245.

Material and methods

Subjects

Male weaning normal albino (Wistar) rats of two months and initial body weight 150-200 g were randomly divided into two groups. The control group (C) received a standard diet (TD-01) and tap water *ad libitum*. The experimental group (E) received a diet deficient in zinc (TD-01-Zn) and tap water *ad libitum*. The rats were kept in a temperature-controlled room (22-24°C) and a 12-hour light/dark cycle. After 12 weeks, the rats were sacrificed by perfusion with 100 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1% heparin and 0.1% EDTA. The testes were removed and weighed. The epididymal spermatozoa were isolated by centrifugation at 1000 g for 10 min and then at 1000 g for 10 min. The spermatozoa were then washed three times with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1% heparin and 0.1% EDTA. The spermatozoa were then resuspended in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1% heparin and 0.1% EDTA. The spermatozoa were then used for the determination of seminal glycosidase activity. The seminal glycosidase activity was determined by the method of Soufrier et al. (1983). The seminal glycosidase activity was expressed as the amount of substrate converted per minute per milligram of protein. The results were expressed as the mean ± SEM. The statistical analysis was performed using Student's *t*-test.

Results