HAL open science

Dosage des acides nucléiques libres et infertilité masculine : perspectives en assistance médicale à la procréation

Pierre Di Pizio

To cite this version:

Pierre Di Pizio. Dosage des acides nucléiques libres et infertilité masculine : perspectives en assistance médicale à la procréation. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01369595

HAL Id: dumas-01369595

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01369595v1

Submitted on 21 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE

FACULTE DE MEDECINE D'AMIENS

ANNEE 2016 N° 2016 - 92

DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES LIBRES ET INFERTILITE MASCULINE : PERSPECTIVES EN ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION

THESE

POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE (DIPLOME D'ETAT) PRÉSENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE HUIT SEPTEMBRE DEUX MILLE SEIZE

Par

DI PIZIO Pierre

PRÉSIDENT DU JURY : Monsieur le Professeur Henri COPIN

JUGES : - Madame le Professeur Nathalie RIVES

- Monsieur le Professeur Gilles DUVERLIE
- Madame le Docteur Rosalie CABRY
- Madame le Docteur Naïma BELHADRI-MANSOURI

DIRECTEUR : Monsieur le Docteur Moncef BEN KHALIFA

À mon Papi Bernard.

DÉDICACES

À Monsieur le Professeur Henri COPIN

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

(Cytologie et Histologie)

1er Assesseur et Assesseur du 1er cycle

Chef du Service de Médecine et Biologie de la Reproduction et de la Cytogénétique

Pôle "Femme - Couple - Enfant"

Chevalier dans l'Ordre des Palmes Académiques

Je tiens à remercier mon Président de Jury pour son expérience, son humour, ses qualités humaines et ses encouragements. J'aimerais lui dire combien je le respecte et l'admire. Depuis ma première année d'études médicales il fait partie de mes Maîtres et restera un point de repère précieux dans mon cursus.

À Madame le Professeur Nathalie RIVES

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Membre correspondant de l'Académie de Médecine

Présidente de la Fédération Française des CECOS

Responsable du centre d'Assistance Médicale à la Procréation et du Laboratoire de Biologie de la Reproduction – CECOS – CHU-Hôpitaux de Rouen

Directrice de l'EA 4308 « Gamétogenèse et Qualité du Gamète »

Chevalier dans l'Ordre des Palmes Académiques

Mes remerciements vont également à Madame le Professeur Rives qui a su m'accueillir à bras ouverts et dans la plus grande bienveillance dans son centre de Biologie de la Reproduction de Rouen. Son avis et ses conseils ont toujours éclairé mes choix. Je la remercie vivement de l'intérêt qu'elle a porté à mon travail et voudrais lui faire part de mon immense respect.

À Monsieur le Professeur Gilles DUVERLIE

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

(Virologie, biologie)

Chef du laboratoire de Virologie

Pôle biologie, pharmacie et santé des populations

Doyen, Directeur de l'Unité de Formation et de Recherche de Pharmacie d'AMIENS

Chevalier dans l'Ordre des Palmes Académiques

Je voudrais exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur Duverlie qui m'a permis, dès mes premières années d'internat, d'entrevoir les innombrables possibilités et satisfactions qu'apporte l'activité de Recherche. Il a su me conseiller et m'orienter vers des projets plus ambitieux, et je l'en remercie vivement.

À Monsieur le Docteur Moncef BEN KHALIFA

Maître de Conférences des Universités

Biologie de la Reproduction

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à mon Directeur de thèse pour sa disponibilité, pour ses conseils et pour son éclairage puissant sur la moindre de mes interrogations. Je le remercie de m'avoir bousculé par moment, de m'avoir soutenu et guidé lorsque c'était nécessaire. C'est avec beaucoup de respect que je lui adresse mes remerciements

À Madame le Docteur Rosalie CABRY-GOUBET

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Cytologie et histologie

Je souhaiterais également adresser mes remerciements les plus sincères à Madame le Docteur Rosalie Cabry pour sa gentillesse, son organisation et sa rigueur. Et je voudrais la remercier d'avoir accepté de faire partie de mon Jury.

À Madame le Docteur Naïma BELHADRI-MANSOURI

Praticien Hospitalier

Biologie de la Reproduction

Je tiens à la remercier pour sa patience, pour sa gentillesse et pour tous les conseils qu'elle m'a donné pendant ma formation. C'est un honneur qu'elle ait accepté de juger mon travail. Je tiens également à la remercier pour sa disponibilité et pour la compréhension dont elle m'a fait part.

À tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce travail,

Je pense à Madame le Docteur Aviva Devaux, Monsieur le Docteur Guillaume Jedraszak, Madame le Docteur Stéphanie Belloc et Monsieur le Docteur Pierre-Alain Menoud, vos conseils, vos relectures, m'ont permis de réaliser cette thèse.

À la génialissime équipe d'Amiens,

Madame le Docteur Emmanuelle Lourdel, Madame le Docteur Florence Scheffler, Madame le Docteur Mélyne Lombart, Élodie, Séverine, Ingrid, Florence, Marie, Dany, Diane et David. Je vous remercie tous pour votre accueil si chaleureux à mon arrivée, pour vos conseils, pour votre soutien, pour votre humour, pour votre gentillesse et pour tous ces souvenirs inoubliables que nous partageons et continuerons à partager. Vous êtes formidables.

À la formidable équipe de Rouen,

Madame le Docteur France Verhaeghe, Madame le Docteur Fanny Jumeau, Madame le Docteur Solmaz Sarandi, Madame le Docteur Isabelle Motte, Monsieur le Professeur Bertrand Macé, Élodie, Sophie, Lydie, Julie, Amandine, Sylvie, Isabelle, Cynthia, Benoît et Romain. Je tiens à vous remercier pour votre accueil, vos sourires, votre gentillesse et vos nombreux conseils. Je ne vous remercierai jamais assez pour les rires et pour les moments que nous avons passé ensemble. Je ne vous oublierai pas.

À Vincent,

J'espère te transmettre tout ce que les gens de l'AMP m'ont appris et je sais que tu réussiras tout ce que tu entreprendras.

À Madame le Docteur Nadia Kazdar,

Mais quelle rencontre. Je te remercie pour ta spontanéité, ta folie, ton humour et pour les nombreux conseils que tu m'as donnés.

À mes proches,

Tout d'abord à ma sœur,

Anne-Laure, tu le sais, tu es ma plus grande fierté. Tu es une personne brillante, solide, bienveillante et complètement désintéressée. J'ai toujours pu compter sur toi, sur ta disponibilité, ton écoute, tes conseils. Tu m'as aidé plus d'une fois dans ma vie et je t'en remercie de tout mon cœur. Tu es quelqu'un de bien petite sœur.

À mes parents,

Je vous remercie d'être vous. Mes deux modèles, imparfaits, humains, justes, bienveillants et toujours compréhensifs. Sans vous rien n'aurait été possible. Mes études, mes rencontres, cette thèse, mon existence. Je vous dois tout. J'espère vous rendre fiers tout au long de ma vie. Je vous aime.

À mes grands-parents, à Mémé,

Tous les quatre, je vous remercie pour tout. Vous avez toujours été présents pour nous, pour moi. Votre expérience, votre sagesse et vos conseils ont toujours dirigé devant moi une lumière bienveillante. À toi Mémé, qui me répétait sans cesse que je deviendrai Docteur. Je vous remercie encore.

À ma famille,

Aux Di Pizio, aux Lerebourg, vous êtes mon socle, mes origines. Je vous remercie tous pour votre soutien, pour vos encouragements et pour vos questions qui m'ont à chaque fois donné confiance en moi et en la médecine. Je serai toujours là pour vous.

À Camille, à Clémentine,

Mes deux amies de presque toujours. Vous êtes formidables. Je vous respecte tellement. Pour votre courage, pour votre amitié infaillible, pour vos conseils, pour votre amour. Nous ne nous quitterons jamais.

À mes potes,

Je n'ai pas toujours été présent avec vous mais je ne vous ai jamais quittés dans mon cœur. Une sacrée meute de loups. Lewis, tu es un peu mon frère. Rien ne nous séparera. Et je te remercie d'être là pour moi. Madou et Yann, merci pour tout.

À Héloïse, à Aurélie, à Clémence,

Plus que des collègues, vous êtes devenues des amies. Je vous remercie pour ça. Sans vous je n'en serais pas là. Je vous remercie pour nos rires aux éclats, nos mardis soirs et nos sujets de discussion farfelus. Et vous avez toute ma gratitude pour vos innombrables conseils donnés sans relâche. « Maman Hélo » tu n'es pas là mais je sais que tu penses à moi.

À Noémie,

Je te remercie pour tout. Tu es mon *mentor*. Tu m'as aiguillé en permanence dans ma formation avec toute ta douceur, ta bienveillance et ton expérience. Ta passion pour l'AMP, ton goût pour la rigueur et les choses bien faites, ton implication et ton altruisme font de toi une personne exceptionnelle que j'ai eu la chance de rencontrer. Je te souhaite tout ce qu'il y a de meilleur à toi, Vincent, Eliot et Josse.

À Cora,

Je te remercie d'être apparue dans ma vie. Je te remercie pour ta simplicité, ta bienveillance, ton sourire ensoleillé et ta gentillesse. Je t'aime bien.

SOMMAIRE

GLOSSAIRE…..……14

1. Introduction
   a. Généralités et revue de la littérature……...……...……15
   b. ADN libre et cancer……....15
   c. ADN libre et fertilité……..…..……...…16
      Versant féminin……..……..…16
      Versant masculin……17
   d. ADN libre et techniques de laboratoire……..…..……18
2. Matériel et Méthodes
   a. Population……..……..……19
   b. Échantillons……...……..……21
   c. Primers, sondes et polymérase……21
   d. Gamme étalon et contrôles internes……....22
   e. Extraction……23
   f. Acquisition des réactions de polymérisations en chaîne……....24
   g. « Trouble shooting » et inhibiteurs de PCR……26
   h. Analyse statistique des résultats……..…26
3. Résultats
   a. Linéarité……..27
   b. Analyse des échantillons……..…27
4. Discussion……..……30
5. Conclusion et perspectives……33

BIBLIOGRAPHIE……...……34

ANNEXES……...……..……...37

GLOSSAIRE

ADN : acide désoxyribonucléique

AMP : assistance médicale à la procréation

ARN : acide ribonucléique

BLEFCO : Biologistes des Laboratoires d'Etudes de la Fécondation et de la Conservation de l'œuf

CECOS : Centre d'Étude et de Conservation des Œufs et du Sperme humains

CF-DNA : cell free DNA

EDTA : éthylène diamine tétra acétique

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FCS : fausse couche spontanée

FT : formes typiques

IMC : indice de masse corporelle

IVG : interruption volontaire de grossesse

kb : kilobases

pb : paires de bases

PCR : polymerase chain reaction

PGR-PROX : partie proximale du gène du récepteur de la progestérone

RASSF1A : Ras association domain-containing protein 1

RNase P : ribonucléase P

RPM : rotations par minute

SDI : Sperm Denaturation Index

TUNEL assay : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

1. Introduction

a. Généralités et revue de la littérature

En 1841, Félicité Robert de Lamennais écrivait déjà dans *Du passé et de l'avenir du peuple* : « L'enfant, lien du père et de la mère, achève la famille et en fait l'unité ». Cet achèvement et cette unité, 170 ans plus tard, restent des désirs prépondérants. Alors que notre société a littéralement changé de visage, nous rencontrons des couples à la fertilité inexorablement en baisse depuis les années 30. Face à cette recherche implacable de parentalité et cette décroissance de natalité, et pour pallier les difficultés de conception naturelle, l'assistance médicale à la procréation a vu le jour. De cette nouvelle spécialité ont découlé toutes les explorations fonctionnelles des différents paramètres mis en jeu. Évidemment, de par la facilité d'accès aux éléments masculins, ceux-ci ont été les premiers à être explorés. En 1677, Antoni van Leeuwenhoek met en évidence des *animalcules* dans le sperme et bouleverse l'idée de génération spontanée. À partir de cette observation, en découleront de nombreuses découvertes et applications en biologie cellulaire. De nos jours, il a évidemment fallu aller plus loin, et s'intéresser au noyau même du spermatozoïde. Mais également à son environnement et notamment aux mécanismes épigénétiques modulant son expression génique.

La présence d'ADN circulant dans le plasma est connue depuis plus de 50 ans, que ce soit chez des patients sains ou malades. Cet ADN est composé d'acides nucléiques double-brin au poids moléculaire plus faible que l'ADN génomique. Il se caractérise par des fragments nucléotidiques de taille variable, allant de 70 à 200 paires de bases pour les plus courts et jusqu'à 21 kb pour les plus longs. Du point de vue physiologique, il existe deux mécanismes cellulaires expliquant ce relargage d'acides nucléiques. Le premier est un mécanisme passif lié aux phénomènes apoptotiques et/ou nécrotiques incluant de l'ADN nucléaire et mitochondrial[1][2]. Cette situation est relativement fréquente et se retrouve chez des patients atteints de pathologies bénignes. Le deuxième est un mécanisme actif[3][4] plutôt mis en évidence dans les contextes oncologiques[5]. Ce dernier est encore peu étudié dans la littérature.

Du point de vue physiopathologique, le taux d'ADN libre circulant est le reflet de l'état apoptotique et nécrotique de l'organisme[6]. Il existe une étroite relation entre le remodelage cellulaire et l'augmentation d'acides nucléiques circulants. L'exemple le plus

connu concerne les patients obèses. Dans cette population, il existe un important remodelage cellulaire inhérent à la synthèse ou à l'apoptose des adipocytes. Ce mécanisme de « turn over » cellulaire permet d'observer un taux élevé d'acides nucléiques circulant dans le plasma[7] de ces patients. Grâce à cette compréhension physiologique de la libération de l'ADN libre plasmatique, les applications diagnostiques en ont découlé.

b. ADN libre et cancer

Le dosage d'acides nucléiques circulants plasmatiques (ADN libre et microARNs) a ouvert de nouvelles perspectives en termes de diagnostic et/ou de pronostic, notamment en cancérologie[5][8][9][10]. En effet, dès les années 70, S.A. Leon *et al.* ont mis en évidence l'intérêt du dosage des acides nucléiques dans le plasma ou le sérum des patients atteints de tumeurs solides pour évaluer leur réponse thérapeutique[11][12]. Ainsi, un taux important d'ADN libre est en relation avec des tumeurs le plus souvent métastasées. Deuxième résultat intéressant, une réponse thérapeutique satisfaisante permet, dans un second temps, d'observer une diminution de ce même taux. Liggett *et al.* sont allés encore plus loin en étudiant le profil de méthylation de cet ADN libre. Grâce à ces observations, ils sont parvenus à différencier les tumeurs bénignes des tumeurs malignes de l'ovaire[13]. Les auteurs ont montré que les profils de méthylation de deux promoteurs (RASSF1A et PGR-PROX) permettaient de distinguer les cancers ovariens d'une part, des pathologies bénignes d'autre part (telles que les cystadénomes séreux). Plus récemment, l'équipe française du Docteur Tissot a mis au point une PCR diagnostique pour évaluer le profil moléculaire des tumeurs pulmonaires. Ils ont également repérer par séquençage la fraction mutée de gènes cibles tel EGFR pour repérer une éventuelle progression tumorale sous traitement[14]. Par là même, ces nouveaux biomarqueurs constituent une avancée tant diagnostique que prédictive et ouvrent de nouvelles perspectives en biologie médicale.

c. ADN libre et fertilité

Versant féminin

En regard de l'aspect cancérologique, même si à l'heure actuelle, très peu d'études s'y sont intéressées, il a été montré qu'il existait une augmentation des taux d'ADN libre et/ou de

microARNs circulants dans le plasma et les liquides folliculaires des patientes présentant des échecs d'implantation[15][16][17][18][19]. Ces variations des taux sériques pourraient être en rapport avec une augmentation de lyses cellulaires étiologiquement méconnues. Le taux d'ADN libre circulant varie en fonction de nombreux paramètres physiologiques, notamment l'âge[6]. Cependant, ce paramètre semble plutôt stable en fonction du cycle ovarien selon Pölcher *et al.*[20]. De plus, il apparaît qu'une étroite relation existe entre les taux d'acides nucléiques circulants (notamment microARNs) dans les liquides folliculaires, le plasma maternel mais aussi les milieux de culture embryonnaires et la qualité des embryons[21]. Le choix des embryons ne dépendrait alors plus uniquement du simple aspect morphologique de ceux-ci (classification des BLEFCO, classification de Gardner…), mais également de son environnement plus ou moins riche en ADN libre. Cet impact probable sur la fertilité pourrait modifier profondément la pratique de la biologie de la reproduction. En effet, un des problèmes majeurs de l'Assistance Médicale à la Procréation est le taux d'implantation faible, et donc de grossesse, de certaines patientes. Ce n'est que depuis une cinquantaine d'années que l'on a mis en évidence l'existence de fragments d'ADN libres non codants dans les différents liquides biologiques de l'organisme. Ainsi, le dosage de ces fragments d'ADN permettrait notamment de prédire de façon non invasive les qualités endométriale et ovocytaire, et indirectement embryonnaire[22][23][24][25] de certaines patientes présentant des échecs d'implantation.

Versant masculin

En dehors du côté féminin et implantatoire, l'exploration de la fertilité masculine a fait de nombreux progrès. Cependant, aucune de ces avancées ne permet d'évaluer de manière fiable le pouvoir fécondant et « qualitatif » du spermatozoïde. Il est pratiqué depuis plusieurs années des tests complémentaires nucléaires permettant d'appréhender certains défauts de maturation du matériel génétique. C'est le cas notamment des tests de fragmentation et de condensation de l'ADN appelés : TUNEL assay et coloration au bleu d'aniline. Le premier examen permet de mettre en évidence les spermatozoïdes entrant en apoptose suite à des dommages nucléaires importants ayant entraîné des brèches ou cassures au niveau du génome[26][27]. Comme l'ont montré Zini *et al.* lorsque l'intégrité nucléaire est altérée cela tend à mettre en évidence un effet négatif sur les taux de grossesse en inséminations intra-utérines. Mais aussi en augmentant les taux de fausses couches en fécondations in vitro classique ou avec micro-injection. Puis, le second examen permet quant à lui, d'explorer la condensation et la dénaturation de la chromatine spermatique par une coloration au bleu

d'aniline. En effet, le remplacement des histones par les protamines au cours de la spermiogenèse est responsable de l'état de compaction chromatinienne spermatique. On sait que cet état est nécessaire à la protection du génome paternel au cours du transit du spermatozoïde dans les voies génitales[28]. Cette technique permet d'améliorer la décision de prise en charge du couple infertile. Ces marqueurs ont beaucoup apporté à la recherche étiologique de l'infertilité et/ou de la stérilité masculine. Mais l'absence de valeur seuil clairement établie de façon internationale et même nationale, explique leurs limites d'utilisation et d'interprétation. En raison de la difficulté de trouver des marqueurs fiables de la qualité spermatique et devant des résultats de fécondation médiocres, l'AMP tente d'explorer de nouveaux moyens diagnostiques. L'exploitation des matrices biologiques générées telles le plasma séminal, les liquides folliculaires ainsi que les milieux de culture embryonnaire pourraient permettre d'explorer l'environnement direct des gamètes et de l'embryon. Le dosage des acides nucléiques libres dans le plasma séminal est, à l'heure actuelle, très peu documenté. De rares équipes chinoises ont commencé à travailler sur ce marqueur[29][30]. Li *et al.* ont montré, pour une faible cohorte que les taux d'ADN libres séminaux étaient significativement plus élevés chez les patients azoospermiques que chez les patients sans anomalies spermatiques[31]. Les résultats exhaustifs ne sont pour le moment pas consultables. Sur la scène européenne, ce marqueur n'est pour le moment pas étudié à notre connaissance.

d. ADN libre et techniques de laboratoire

La mise en évidence des acides nucléiques circulants a commencé avec les Southern blots dans les années 50, techniques lourdes, de manipulations délicates et au rendement très faible. Puis, l'ELISA a fait son apparition. Certes, il s'agissait d'une technique plus sensible mais tout de même très influencée par les perturbateurs immunologiques (réactions croisées…). Enfin, la PCR quantitative en temps réel se prête idéalement à ce type de dosage. Il s'agit effectivement une technique simple, de réalisation rapide, d'interprétation aisée et dont l'échantillon primaire est « facilement » collectable. Par conséquent, l'objectif de ce travail est de mettre au point une technique fiable, robuste, répétable et reproductible au sein du service de Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS du Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens. Cette thèse a pour but de décrire le premier temps d'élaboration du protocole et sa réalisation sur une faible cohorte de patients fertiles et

infertiles au sein de trois centres : le laboratoire Eylau-Saint Didier avec Madame le Docteur Belloc Stéphanie, le centre d'AMP du CHU de Rouen avec Madame le Professeur Rives Nathalie et notre service au CHU Amiens-Picardie.

2. Matériel et Méthodes

a. Population

Les patients ont été inclus en 2 groupes. Le premier est constitué par des hommes en âge de procréer, dont les paramètres spermatiques sont strictement normaux (*table 2*). Ce groupe est considéré comme le groupe contrôle. Notre référentiel est le *World Health Organization reference values for human semen characteristics*, publié en 2010[32]. Il s'agit du référentiel international utilisé dans tous les centres d'AMP. Les critères d'inclusion du second groupe sont constitués par des hommes ayant une altération d'au moins un paramètre spermatique parmi (*table 1*) :

- absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat après centrifugation : azoospermie

- diminution de la numération spermatique : oligozoospermie (< 15 millions/ml)

- mobilité à 1h post-éjaculation, diminuée : asthénozoospermie (< 32 % de mobilités a + b)

- augmentation des anomalies morphologiques polymorphes : tératozoospermie (> 85% de formes atypiques)

- anomalies nucléaires à type de taux de fragmentation de l'ADN élevé (TUNEL assay avec un résultat > 4 %) et/ou de taux de condensation chromatinienne élevé (coloration au bleu d'aniline avec un résultat > 20 %)

Il est important de noter que les seuils utilisés pour les taux de fragmentation et de condensation de l'ADN spermatique ne font pas l'unanimité dans la communauté scientifique. Nous avons fait le choix de ces valeurs par nécessité. La valeur de 4 % pour la fragmentation est relativement basse mais est établie comme telle au CHU de Rouen. Pour des raisons de facilité d'inclusion, nous avons donc choisi ce seuil.

Table 1. Caractéristiques de la population « anomalies spermatiques ».

Variable	Moyenne	Min-Max	Ecart-type
Age (années)	35,29	28 – 49	5,56
Volume (mL)	3,22	1 – 6,9	1,46
pH	8,47	7,9 – 9,5	0,41
Concentration (M/mL)	49,59	0 – 185,6	47,78
Numération (M/éjaculat)	154,43	0 – 436,48	143,81
FR (M/mL)	0,54	0,1 – 3	0,71
Mobilité (a + b) (%)	34,06	7 – 68	17,47
FT (%)	10,47	3 – 15	3,20
Fragmentation (%)	7,82	1 – 19	5,71
SDI (%)	15,47	9 – 26	4,81

Table 2. Caractéristiques de la population « témoins ».

Variable	Moyenne	Min-Max	Ecart-type
Age (années)	35,29	28 – 49	5,66
Volume (mL)	4,09	1,9 – 13	2,32
pH	8,1	7,9 – 8,7	0,21
Concentration (M/mL)	51,49	18 – 192	42,33
Numération (M/éjaculat)	196,99	43,2 – 633,6	157,42
FR (M/mL)	0, 34	0 – 1,4	0,39
Mobilité (a + b) (%)	38,66	33 – 45	3,72
FT (%)	24,33	16 – 43	7,05
Fragmentation (%)	5	1 – 10	2,70
SDI (%)	7,86	2 – 20	4,64

b. Échantillons

L'échantillon primaire de cette étude a été du plasma séminal. Le prélèvement a été recueilli selon un protocole standardisé utilisé quotidiennement dans nos services. Ce protocole consiste en une toilette et une désinfection locale des mains et de la verge afin d'éviter une contamination bactérienne par la flore commensale avant masturbation. Puis, un questionnaire clinico-biologique est complété pour chacun des patients, avec notamment un délai d'abstinence de 2 à 5 jours devant être scrupuleusement respecté (Annexes, Document 1). Chaque échantillon est le rebut issu d'une analyse spermatique de routine. L'échantillon a été anonymisé pour l'analyse. Puis, chaque tube est centrifugé 10 minutes à 1300 rotations/min (RPM). Le surnageant est aliquoté et congelé à -20°C en vue de l'extraction. Les échantillons provenant des autres centres ont subi le même traitement pré-analytique pour être acheminés au CHU d'Amiens sous forme congelée.

c. Primers, sondes et polymérase

Nous avons utilisé la séquence du gène de la RNase P comme primer (*table 3*). En effet, cette endoribonucléase est présente dans toutes les cellules vivantes de l'organisme[25] et est constituée de séquences hautement conservées. Ses spécificités cellulaires ubiquitaires nous permettent donc de prendre le gène de cette protéine comme cible de notre PCR. Le design des primers a écarté le risque d'amplifier de l'ARN en allongeant légèrement les séquences nucléotidiques, ce qui modifie la taille des produits d'amplification (86 pb contre 60 pb pour un primer standard). Les températures de fusion étaient de 57,4°C pour le primer « forward » et de 59,6°C pour le primer « reverse ».

En ce qui concerne la sonde, nous avons utilisé le SYBR Green. Ce composé organique aromatique fait partie de la grande famille des fluorophores. Il présente dans ses propriétés la capacité de se fixer de façon aspécifique sur n'importe quel acide nucléique double brin. Il est important de noter que cette molécule n'est pas un agent intercalant.

Concernant la polymérase, essentielle à l'élongation nucléotidique, nous avons utilisé une *Taq* polymérase stable, sans activité enzymatique à température ambiante. L'enzyme est activée durant l'étape de dénaturation après 20 secondes à 95°C (données fournisseur).

Table 3. Séquence des primers utilisés.

RNase P forward primer	5’ AGA TTT GGA CCT GCG AGC G 3’
RNase P reverse primer	3’ GAA GCC GGG GCA ACT CAC 5’

d. Gamme étalon et contrôles internes

Dans le cadre d’une PCR quantitative, nous avons dû établir une gamme étalon. Pour ce faire, nous avons utilisé de l’ADN humain à une concentration standardisée établie par mesure d’une fluorescence quantitative sur l’automate Qubit® de la société Life Technologies®. Puis nous avons effectué des dilutions en « cascade » pour obtenir 4 points de concentration : 0.2 µg/mL ; 2 µg/mL ; 10 µg/mL ; 20 µg/µmL. De cette gamme, nous tirons une droite d’étalonnage dont les concentrations la plus haute et la plus basse encadrent nos échantillons (figure 1).

Le choix de travailler en « duplicate » pour chaque puits s’est imposé à nous pour ne pas avoir à introduire un contrôle positif sur chaque plaque de PCR. En effet, de cette façon chaque puits est le contrôle de son « double ». De plus, nous avons associé les deux valeurs afin d’en obtenir la valeur finale par une simple moyenne.

Enfin, pour chaque plaque, nous avons choisi de réserver deux puits au contrôle négatif. Ces deux puits seront nommés « Blanc 1 » et « Blanc 2 ». Dans ces puits, nous y avons déposé le MasterMix et de l’eau pure.

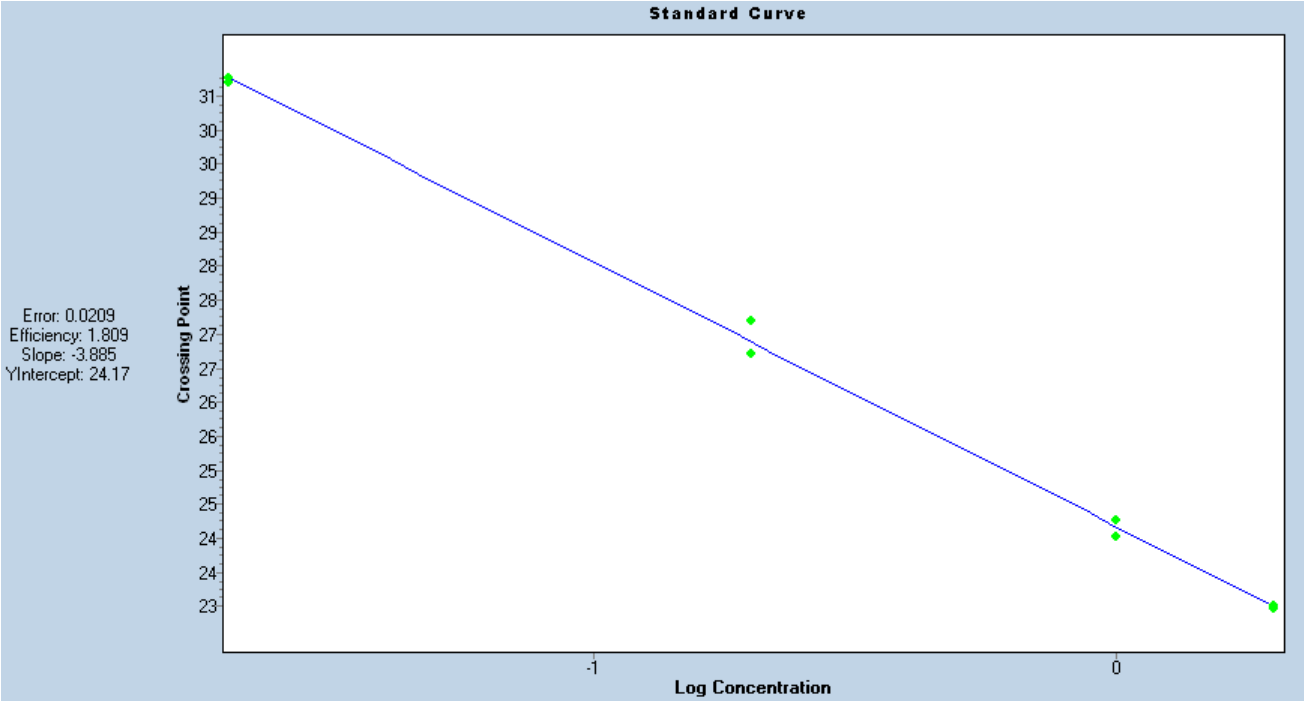

Fig. 1. Courbe d'étalonnage en 4 points de concentration (« standard curve »).

e. Extraction des acides nucléiques

L'extraction des différents prélèvements s'est faite avec le kit Qiagen® QIAmp® Fast DNA Stool (Annexes, Document 2). Ce kit utilise la méthode d'extraction dite sur « colonnes » avec une membrane en silicate-gel fixant les acides nucléiques utilisant le principe de la séparation par affinité. La prise d'essai était de 200 µL pour chaque échantillon donnant un volume final d'élution de 50 µL. Ce dernier volume a été modifié par rapport aux données du fournisseur afin de concentrer l'éluât.

Chaque technique d'extraction s'est faite dans une pièce dédiée, à température ambiante, sous hotte à flux laminaire et après nettoyage soigneux de la paillasse pour éviter au maximum les contaminations.

f. Acquisition des réactions de polymérisations en chaîne

Nous avons travaillé sur des plaques de 96 puits adaptées au thermocycleur, en utilisant un volume de réaction de 25 µL se composant de la sorte : 2,5 µL de primers ; 12.5 µL de MasterMix (SYBR Green, *Taq* polymérase, acides désoxyribonucléiques et $MgCl_2$) ; 5 µL d'eau pure ; 5 µL d'échantillon à tester.

Pour chaque technique, un plan de plaque daté du jour a été créé afin de faciliter les dépôts dans les différents puits et d'éviter les risques d'erreur (Annexes, Document 3).

L'uniformité et l'homogénéité des produits de PCR ont été confirmées par l'analyse de la courbe de fusion en fin de cycle.

Les réactions et l'acquisition par mesure de la fluorescence se sont faites sur le Light Cycler 480® de Roche® (figure 2 et 3). Nous avons réalisé la PCR quantitative selon le programme suivant :

- dénaturation initiale : 15 min à 95°C
- phase de dénaturation : 5 sec à 95°C
- phase d'hybridation : 20 sec à 58°C
- phase d'élongation : 15 sec à 72°C

} x 45 cycles

- 2 min à 95°C
- 2 min à 50°C
- acquisition continue à 90°C

} Courbe de fusion (« melting curve »)

- refroidissement (« cooling »)

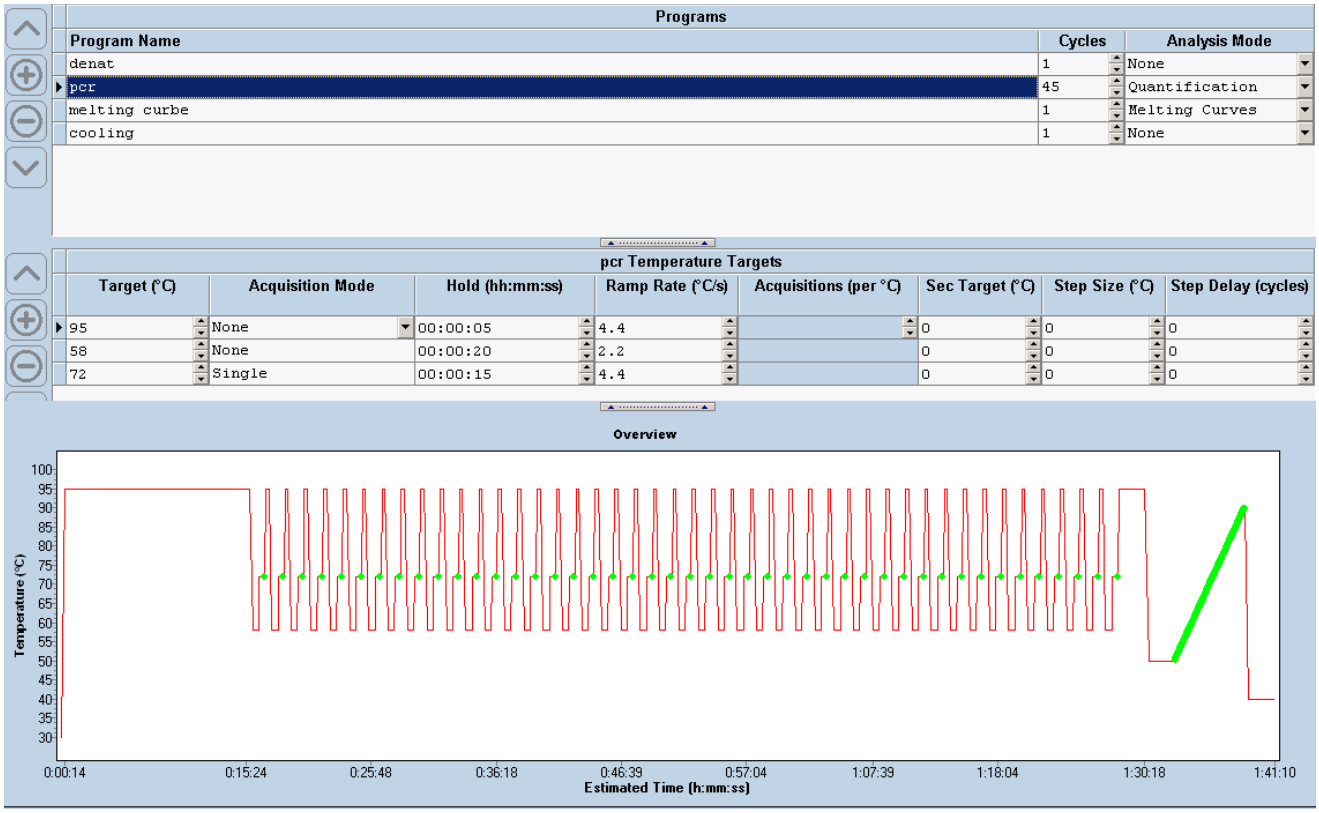

Fig. 2. Protocole de PCR et acquisition.

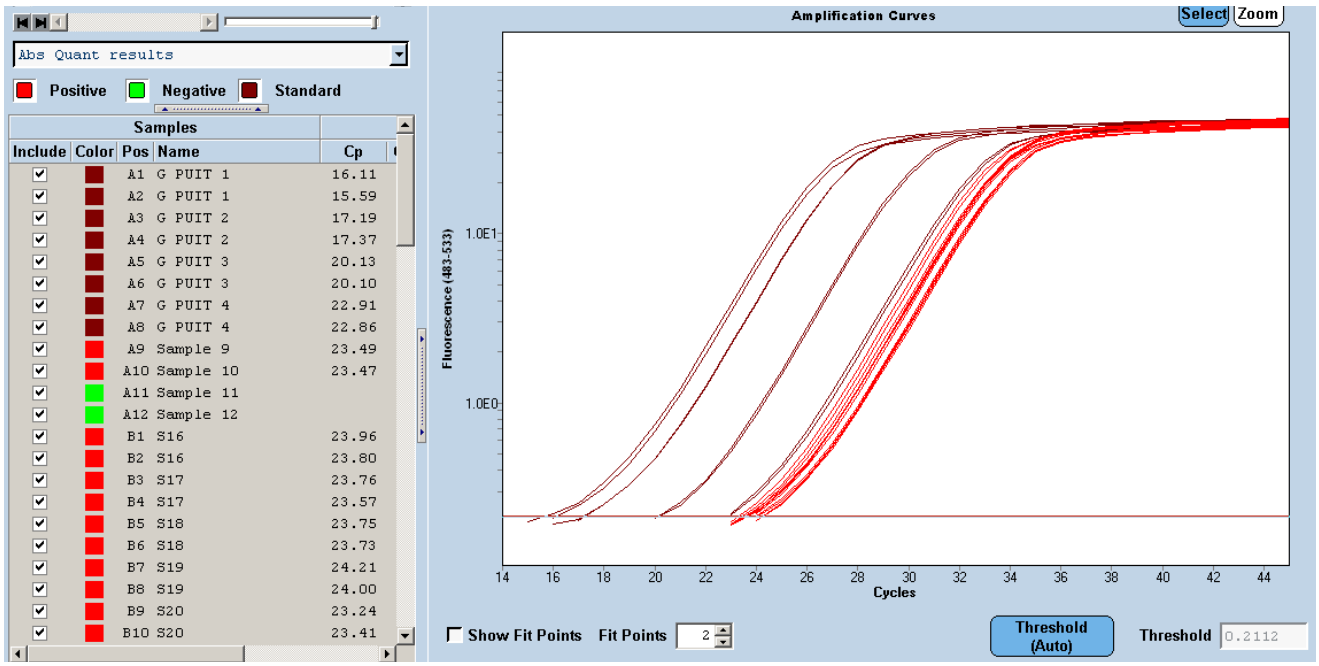

Fig. 3. Courbes d'amplification après 45 cycles de PCR.

g. « Trouble shooting » et inhibiteurs de PCR

Le plasma séminal est connu pour contenir de fortes concentrations d'inhibiteurs de PCR. Celui-ci est composé d'eau, de protéines, d'oligo-éléments et de complexes muco-poly-saccharidiques. Lors de l'acquisition des réactions, il est arrivé que certains échantillons ne soient pas amplifiés. Devant de tels résultats, il est alors très probable que les réactions de PCR aient été inhibées.

Nous avons alors mis en place un protocole de dilutions successives afin de diminuer le pouvoir inhibiteur de la molécule. La première dilution se fait au ½ puis au ¼ et enfin au 1/8. Puis, nous avons analysé l'échantillon dilué comme un échantillon standard. Nous n'avons jamais eu à diluer au-delà du 1/8. La PCR étant une technique très sensible et très spécifique, une très faible quantité d'ADN libre peut être amplifiée lorsque l'inhibiteur est suffisamment dilué.

h. Analyse statistique des résultats

Pour chaque patient nous avons travaillé en « duplicate ». Ce qui signifie que chaque dosage est une moyenne de deux résultats. L'analyse des résultats s'est faite sur le site GraphPad® en utilisant l'application Prism®. Nous avons d'abord procédé à l'analyse des deux groupes « anomalie spermatique indifférenciée » *versus* « témoins ». Puis, nous avons divisé en quatre groupes la population pathologique en « azoospermie », « oligozoospermie », « tératozoospermie » et « asthénozoospermie ».

Pour chaque analyse, nous avons apparié les patients selon l'âge, puisque nous avons vu précédemment que le taux de cf-DNA pouvait être lié au vieillissement cellulaire[6].

Nous avons utilisé le test des rangs signés de Wilcoxon pour des échantillons appariés car le nombre de sujets étudiés ne permettait pas l'emploi du test *t* de Student pour comparer la population témoin *versus* la population de patients atteints d'anomalie spermatique. Nous avons utilisé le test de Mann-Whitney pour analyser chaque sous-population *versus* les patients témoins appariés à l'âge.

3. Résultats

a. Linéarité

Nous avons effectué toutes nos manipulations en disposant sur chaque plaque 4 puits à des concentrations connues. Nous avons donc analysé à chaque fois, la linéarité de notre droite d'étalonnage. Il est impératif que la pente de cette droite avoisine une efficience à 2 (limite d'acceptabilité de linéarité de la gamme étalon).

De plus, la linéarité est évaluée par le coefficient de détermination *R* (ou coefficient de corrélation). Pour chaque plaque passée, le logiciel du thermocycleur calcule un risque d'erreur (figure1). Pour obtenir le coefficient *R*, nous devons soustraire ce risque d'erreur à la valeur 1. La linéarité de cette gamme étalon est satisfaisante lorsque *R* se rapproche de 1. Par exemple, sur la figure 1, le thermocycleur calcule un risque d'erreur à 0,0209. Nous obtenons donc un coefficient R = 0,9791.

b. Analyse des échantillons

Chaque échantillon de plasma séminal a été analysé en duplicate. De ces deux valeurs nous avons calculé la moyenne des concentrations. Les valeurs ont été mesurées en µg/mL. La minimale a été mesurée à 0,56 µg/mL alors que la valeur la plus haute était à 4,89 µg/mL.

Le groupe « témoins » a des concentrations d'ADN libre séminal à 1,18 ± 0,62 µg/mL avec une minimale à 0,56 µg/mL et une maximale à 2,81 µg/mL. Alors que le groupe « anomalie spermatique indifférenciée » (cas) obtient une concentration moyenne de 2,09 ± 0,87 µg/mL avec une minimale à 1,12 µg/mL et une maximale à 4,89 µg/mL. Le groupe de cas a une concentration d'ADN libre séminal significativement plus élevée que le groupe témoin (p = 0,0003) (Figure 4).

Les seuils et les techniques utilisés dans les différents centres de notre travail concernant les tests de fragmentation et de dénaturation de l'ADN spermatique ne nous ont pas permis de comparaison significative. Par conséquent, la population des patients « pathologiques » avec un taux de fragmentation élevé a présenté des concentrations d'ADN libre à 1,64 ± 0,31 µg/mL *versus* 1,05 ± 0,45 µg/mL (p = 0,03) pour les patients témoins appariés (Figure 7). Concernant les taux de condensation chromatinienne, les patients ayant

un SDI > 20 % avaient un taux de cf-DNA à 1,73 ± 0,25 µg/mL *versus* 1,26 ± 0,44 µg/mL pour les témoins (p = 0,36).

L'analyse de chaque anomalie *versus* les témoins appariés a montré :

- Une augmentation significative (p = 0,03) du taux de cf-DNA séminal chez les patients azoospermiques (3,65 ± 0,88 µg/mL) par rapport aux témoins appariés (1,34 ± 0,41 µg/mL) (Figure 5).
- Une augmentation significative (p = 0,008) du taux d'ADN libre chez les patients tératospermiques (1,80 ± 0,33 µg/mL) par rapport aux témoins (1,29 ± 0,62 µg/mL) (Figure 6).
- Une absence de différence significative entre les concentrations d'ADN circulant séminal chez les patients oligozoospermiques (1,75 ± 0,33 µg/mL) et les témoins (1,76 ± 0,78 µg/mL).
- Une absence de différence significative entre les taux de cf-DNA séminal des patients asthénospermiques (1,57 ± 0,27 µg/mL) et les témoins appariés (1,56 ± 0,69 µg/mL).

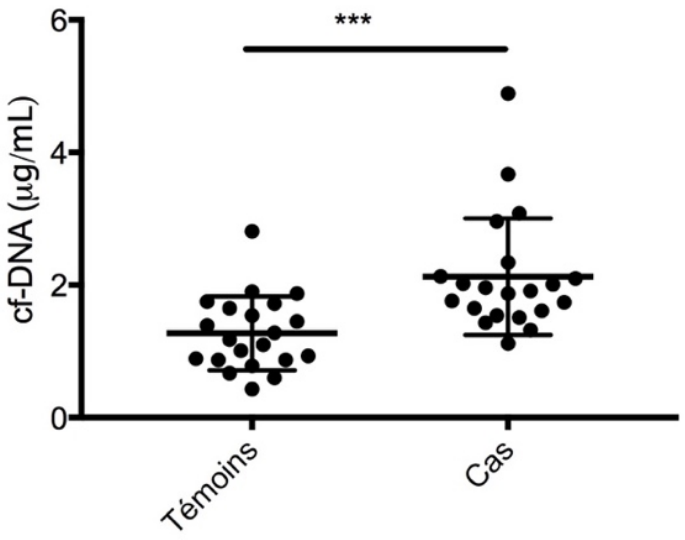

Fig. 4. Comparaison globale des taux d'ADN libre séminal témoins (n = 21) *versus* cas (n = 21).

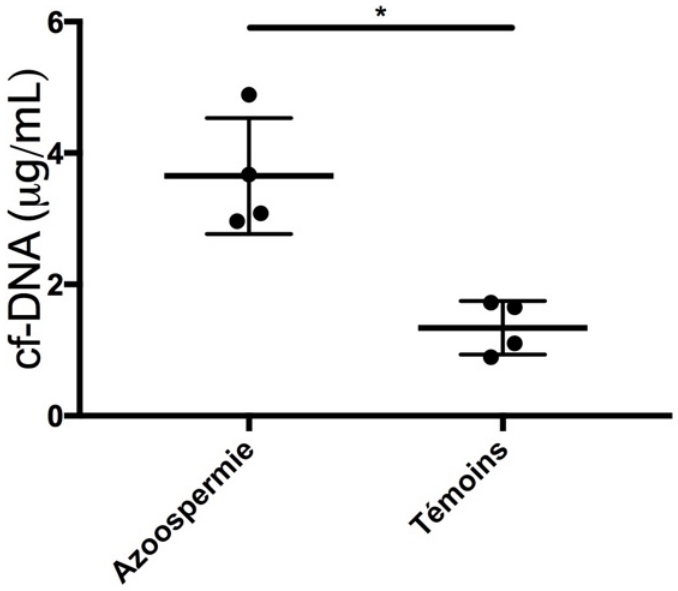

Fig. 5. Comparaison des taux d'ADN libre séminal entre les azoospermies (n = 4) et les témoins (n = 4).

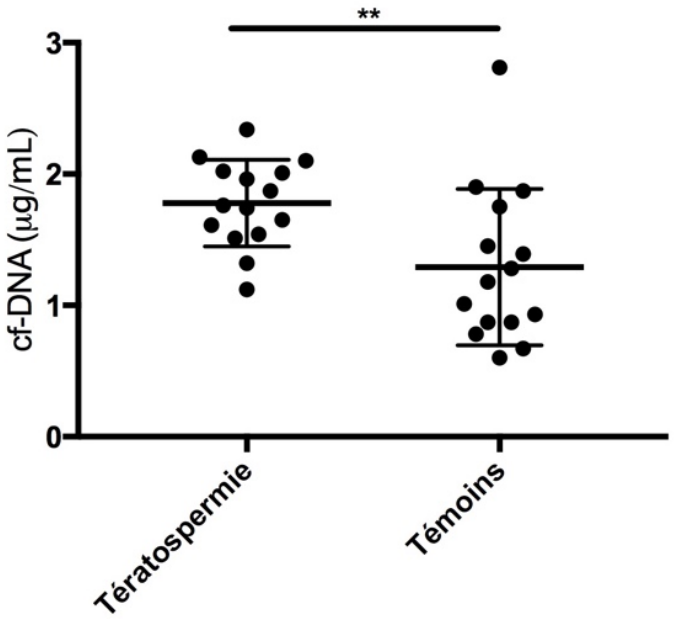

Fig. 6. Comparaison des taux d'ADN circulant séminal entre les tératozoospermies (n = 15) et les témoins (n=15).

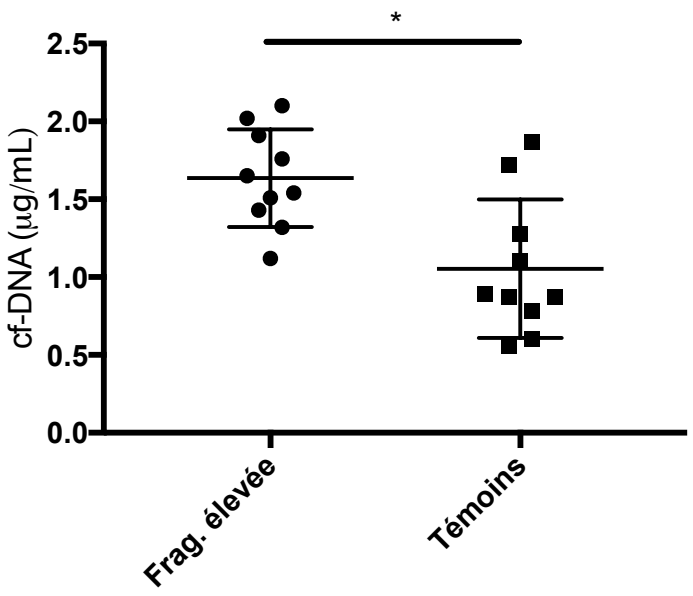

Fig. 7. Comparaison des taux d'ADN circulant séminal entre le groupe « fragmentation élevée » (n = 10) et les témoins appariés (n = 10).

4. Discussion

À notre connaissance, c'est la première étude réalisée sur le dosage d'ADN libre dans le plasma séminal utilisant une PCR en temps réel et le primer de la RNase P. Notre étude a porté sur un petit échantillon de patients. L'objectif était de démontrer la présence d'acides nucléiques libres dans le plasma séminal. Or, nous voyons que notre PCR a parfaitement bien fonctionné et a permis des amplifications satisfaisantes.

Dans un premier temps, nous voyons que la technique est assez longue à réaliser. En effet, la méthode d'extraction manuelle est fastidieuse et potentiellement risque d'erreur. C'est pour cela que chaque manipulation a été menée pour un nombre réduit de patients (maximum 8). De plus, le CHU ne disposant que d'un seul thermocycleur Light Cycler 480®, nous avons rapidement été limité pour l'inclusion de nouveaux patients. À l'avenir, l'utilisation d'extracteur automatisé pourrait permettre la mise en place d'une analyse de routine.

Dans un second temps, les résultats de cette cohorte relativement restreinte semblent encourageants. En effet, nous voyons que la concentration moyenne globale des patients « sains » est de 1,18 ± 0,62 µg/mL lorsque celle des patients porteurs d'anomalies spermatiques est de 2,09 ± 0,87 µg/mL avec une différence hautement significative (p =

0,003). Il existe par ailleurs une différence significative (p = 0,03) entre les patients ayant une azoospermie et les patients témoins. Li *et al*. avaient déjà abordé ce phénomène. Deux hypothèses peuvent être évoquées.

La première concerne une spermatogenèse abortive. Il convient d'abord de préciser que les patients inclus dans ce sous-groupe sont tous porteurs d'une azoospermie non obstructive. Par conséquent, ces quatre patients ont bénéficié d'une biopsie testiculaire. Une seule intervention a permis la congélation de spermatozoïdes mobiles utilisables en fécondation *in vitro* avec injection intra-cytoplasmique. Cela étant, l'absence de spermatozoïdes sur un prélèvement chirurgical ne garantit pas de façon certaine une réelle disparition des cellules souches spermatiques. Chez les patients azoospermiques, nous savons qu'il existe dans certains cas, des cellules souches germinales qui entament leur différenciation d'abord par des méioses puis par une maturation cellulaire. Cette « marche en avant » est sans cesse contrôlée par des check point qui peuvent être à l'origine d'un arrêt et d'une dégradation des cellules « défectueuses ». Ainsi, l'entrée en apoptose de ces cellules porteuses d'anomalies, notamment chromosomiques[33], va augmenter les taux d'ADN libre séminal.

La deuxième hypothèse viserait plutôt un phénomène inflammatoire et immunologique. Celui-ci serait spécifique ou au contraire, totalement aspécifique. D'abord, le versant infectieux peut être évoqué. Ce phénomène inflammatoire spécifique provoquerait une lyse cellulaire et une phagocytose avec libération dans des exosomes[3] d'acides nucléiques dégradés par des endonucléases et des DNases. Puis, le versant immunologique peut également entrer en jeu. De façon aspécifique cette fois, l'inflammation peut avoir une origine traumatique, calorique, idiopathique ou encore générale. L'environnement testiculaire peut être alors déséquilibré et entraîner une nécrose et/ou une apoptose des cellules de soutien.

Il semble nécessaire d'explorer la physiopathologie de cette « hypersécrétion » d'ADN libre. La synthèse du liquide séminal s'effectue à 90 % dans des glandes à renouvellement cellulaire important. La prostate et les vésicules séminales libèrent de façon active et/ou passive des acides nucléiques circulants[4][5] de par leur « turn over » cellulaire. L'autre hypothèse, viserait à identifier les mécanismes de mauvais fonctionnement des DNases, qui seraient alors dépassées par les taux de cf-DNA. Nous savons que ces enzymes sont dépendantes d'ions tels que le Ca^{2+}, le Mg^{2+} ou encore le Zn^{2+}. Il n'est pas exclu que dans certaines pathologies spermatiques, notamment inflammatoires, ces concentrations ioniques

soient perturbées. Hormis la déficience de ces DNases, nous pouvons également évoquer le manque de synthèse de ces enzymes qui peut être inférieur à la normale.

De plus, il n'est pas exclu que certaines pathologies bénignes ou malignes ne soient pas identifiées au moment de l'analyse. Et il est clairement identifié que les taux d'ADN libre puissent être augmentés dans ces cas. Nous pensons notamment aux hypertrophies bénignes de prostate, voire au cancer prostatique, même si la population étudiée est visiblement différente des patients atteints de telles pathologies.

Enfin, nous avons vu qu'il existe une différence significative ($p = 0,008$) des taux de cf-DNA entre les patients porteurs d'une tératozoospermie importante et les témoins appariés. Il nous faut alors évoquer l'hypothèse d'une spermiogenèse déficiente. Ainsi, lorsque la maturation spermatique est mauvaise, les check point cellulaires entrent en jeu et provoquent une entrée en apoptose de ces éléments défectueux. Ceci pourrait expliquer l'augmentation significative du taux d'acides nucléiques chez ce groupe de patients.

Nous voyons qu'il existe une augmentation des taux d'ADN libre séminal chez les patients porteurs d'anomalies morphologiques mais aussi chez les patients azoospermiques. Afin de confirmer l'origine spermatique (cas de la tératozoospermie) ou germinale (cas des azoospermies) il sera nécessaire d'approfondir les explorations anatomopathologiques et biomoléculaires. Comme nous l'avons vu précédemment, l'ADN libre pourrait également être originaire des cellules épithéliales, conjonctives ou encore de soutien des tissus testiculaire, épididymaire, prostatique, voire canalaire (déférents, canaux éjaculateurs, urètre…). L'élaboration d'un primer spécifique spermatique serait une solution.

Il important de souligner également, le nombre restreint de sujets étudiés. Cette étude princeps est une ouverture à des investigations plus profondes. Elle va permettre d'étudier dans notre centre, les différentes interactions de ces fragments nucléiques avec les possibles cellules cibles. Notamment en étudiant les profils de méthylation de cet ADN.

De plus, ce travail soulève énormément de questions et d'hypothèses qu'il va falloir explorer par le futur. Nous pensons notamment à doser les taux de DNases afin d'identifier une cause possiblement curable.

En résumé, il nous reste encore beaucoup de chemin à parcourir pour identifier le rôle exact de ces molécules aux potentiels diagnostic, pronostic et thérapeutique très important.

5. Conclusion et perspectives

Pour conclure, ce travail a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives dans notre centre. En effet, très peu de laboratoires pratiquent cette analyse. Nous avons pu montrer que cette technique de PCR était réalisable au CHU d'Amiens. Pour le moment elle reste cantonnée au domaine de la recherche. Cependant, l'apparition d'un kit spécifique, la publication d'études en cours et l'intérêt grandissant de la communauté scientifique pour ces acides nucléiques circulants vont changer notre regard sur ces molécules jusque-là très peu utilisées.

Nous pensons spontanément à ce dosage dans le cadre des biopsies testiculaires notamment. Ainsi, s'il apparaît, après des investigations solides, une relation linéaire entre les taux d'ADN libre séminal et la présence ou non de spermatozoïdes à la biopsie testiculaire, cela éviterait un acte chirurgical non dénué de conséquences.

BIBLIOGRAPHIE

[1] S. Traver, S. Assou, E. Scalici, D. Haouzi, T. Al-Edani, S. Belloc, et S. Hamamah, « Cell-free nucleic acids as non-invasive biomarkers of gynecological cancers, ovarian, endometrial and obstetric disorders and fetal aneuploidy », *Hum. Reprod. Update*, vol. 20, n° 6, p. 905‑923, nov. 2014.

[2] D. S. Pisetsky et A.-M. Fairhurst, « The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells », *Autoimmunity*, vol. 40, n° 4, p. 281‑284, juin 2007.

[3] P. B. Gahan, P. Anker, et M. Stroun, « Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1137, p. 7‑17, août 2008.

[4] M. Stroun, J. Lyautey, C. Lederrey, A. Olson-Sand, et P. Anker, « About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release », *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, vol. 313, n° 1‑2, p. 139‑142, nov. 2001.

[5] E. Y. Rykova, E. S. Morozkin, A. A. Ponomaryova, E. M. Loseva, I. A. Zaporozhchenko, N. V. Cherdyntseva, V. V. Vlassov, et P. P. Laktionov, « Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content », *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 12, n° sup1, p. S141‑S153, mai 2012.

[6] J. Jylhävä, T. Nevalainen, S. Marttila, M. Jylhä, A. Hervonen, et M. Hurme, « Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty », *Aging Cell*, vol. 12, n° 3, p. 388‑397, juin 2013.

[7] M. Haghiac, N. L. Vora, S. Basu, K. L. Johnson, L. Presley, D. W. Bianchi, et S. Hauguel-de Mouzon, « Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women », *Obes. Silver Spring Md*, vol. 20, n° 11, p. 2213‑2219, nov. 2012.

[8] H. Schwarzenbach, D. S. B. Hoon, et K. Pantel, « Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, n° 6, p. 426‑437, juin 2011.

[9] V. V. Vlassov, P. P. Laktionov, et E. Y. Rykova, « Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers », *Curr. Mol. Med.*, vol. 10, n° 2, p. 142‑165, mars 2010.

[10] E. Gormally, E. Caboux, P. Vineis, et P. Hainaut, « Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance », *Mutat. Res.*, vol. 635, n° 2‑3, p. 105‑117, juin 2007.

[11] S. A. Leon, B. Shapiro, D. M. Sklaroff, et M. J. Yaros, « Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy », *Cancer Res.*, vol. 37, n° 3, p. 646‑650, mars 1977.

[12] A. A. Kamat, F. Z. Bischoff, D. Dang, M. Baldwin, L. Y. Han, Y. G. Lin, W. M. Merritt, C. N. Landen, C. Lu, D. M. Gershenson, J. L. Simpson, et A. K. Sood, « Circulating cell-free DNA: A novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma », *Cancer Biol. Ther.*, vol. 5, n° 10, p. 1369‑1374, oct. 2006.

[13] T. E. Liggett, A. Melnikov, Q. Yi, C. Replogle, W. Hu, J. Rotmensch, A. Kamat, A. K. Sood, et V. Levenson, « Distinctive DNA methylation patterns of cell-free plasma DNA in women with malignant ovarian tumors », *Gynecol. Oncol.*, vol. 120, n° 1, p. 113‑120, janv. 2011.

[14] C. Tissot, S. Villar, M. Olivier, et S. Couraud, « [Free circulating DNA as a tool for lung cancer patients management] », *Rev. Pneumol. Clin.*, vol. 72, n° 1, p. 61‑71, févr. 2016.

[15] J. Czamanski-Cohen, O. Sarid, J. Cwikel, E. Levitas, E. Lunenfeld, A. Douvdevani, et I. Har-Vardi, « Decrease in cell free DNA levels following participation in stress reduction techniques among women undergoing infertility treatment », *Arch. Womens Ment. Health*, vol. 17, n° 3, p. 251‑253, juin 2014.

[16] J. Czamanski-Cohen, O. Sarid, J. Cwikel, E. Lunenfeld, A. Douvdevani, E. Levitas, et I. Har-Vardi, « Increased plasma cell-free DNA is associated with low pregnancy rates among women undergoing IVF-embryo transfer », *Reprod. Biomed. Online*, vol. 26, n° 1, p. 36‑41, janv. 2013.

[17] E. A. Hart, W. C. Patton, J. D. Jacobson, A. King, J. Corselli, et P. J. Chan, « Luteal phase serum cell-free DNA as a marker of failed pregnancy after assisted reproductive technology », *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 22, n° 5, p. 213‑217, mai 2005.

[18] E. Scalici, S. Traver, N. Molinari, T. Mullet, M. Monforte, E. Vintejoux, et S. Hamamah, « Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality », *Hum. Reprod. Oxf. Engl.*, vol. 29, n° 12, p. 2661‑2669, déc. 2014.

[19] E. Scalici, S. Traver, T. Mullet, A. Ferrières, M. Monforte, E. Vintejoux, et S. Hamamah, « [Circulating nucleic acids and in vitro fertilization] », *Gynécologie Obstétrique Fertil.*, vol. 42, n° 10, p. 696‑701, oct. 2014.

[20] M. Pölcher, J. Ellinger, S. Willems, O. El-Maarri, T. Höller, C. Amann, M. Wolfgarten, C. Rudlowski, W. Kuhn, et M. Braun, « Impact of the Menstrual Cycle on Circulating Cell-free DNA », *Anticancer Res.*, vol. 30, n° 6, p. 2235‑2240, janv. 2010.

[21] M. Dimopoulou, G. Anifandis, C. I. Messini, K. Dafopoulos, S. Kouris, S. Sotiriou, M. Satra, N. Vamvakopoulos, et I. E. Messinis, « Follicular fluid oocyte/cumulus-free DNA concentrations as a potential biomolecular marker of embryo quality and IVF outcome », *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, p. 289306, 2014.

[22] S. Stigliani, P. Anserini, P. L. Venturini, et P. Scaruffi, « Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation »,

Hum. Reprod. Oxf. Engl., vol. 28, n° 10, p. 2652‑2660, oct. 2013.

[23] S. Baka et A. Malamitsi-Puchner, « Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review », *Reprod. Biomed. Online*, vol. 12, n° 4, p. 500‑506, avr. 2006.

[24] F. Aydiner, C. E. Yetkin, et E. Seli, « Perspectives on emerging biomarkers for non-invasive assessment of embryo viability in assisted reproduction », *Curr. Mol. Med.*, vol. 10, n° 2, p. 206‑215, mars 2010.

[25] N. Jarrous et R. Reiner, « Human RNase P: a tRNA-processing enzyme and transcription factor », *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, n° 11, p. 3519‑3524, juin 2007.

[26] A. Zini et M. Sigman, « Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons », *J. Androl.*, vol. 30, n° 3, p. 219‑229, juin 2009.

[27] D. P. Evenson, « The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility », *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 169, p. 56‑75, juin 2016.

[28] J. Auger, M. Mesbah, C. Huber, et J. P. Dadoune, « Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men », *Int. J. Androl.*, vol. 13, n° 6, p. 452‑462, déc. 1990.

[29] L.-P. Wang et H.-G. Li, « [Cell-free RNA in human seminal plasma: characteristics and potential application] », *Zhonghua Nan Ke Xue Natl. J. Androl.*, vol. 18, n° 10, p. 936‑939, oct. 2012.

[30] C.-L. Wu, H.-G. Li, et C.-H. Zhu, « [Advances in the studies of cell-free seminal DNA] », *Zhonghua Nan Ke Xue Natl. J. Androl.*, vol. 19, n° 7, p. 652‑656, juill. 2013.

[31] H.-G. Li, S.-Y. Huang, H. Zhou, A.-H. Liao, et C.-L. Xiong, « Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities », *Asian J. Androl.*, vol. 11, n° 6, p. 703‑709, nov. 2009.

[32] T. G. Cooper, E. Noonan, S. von Eckardstein, J. Auger, H. W. G. Baker, H. M. Behre, T. B. Haugen, T. Kruger, C. Wang, M. T. Mbizvo, et K. M. Vogelsong, « World Health Organization reference values for human semen characteristics », *Hum. Reprod. Update*, vol. 16, n° 3, p. 231‑245, janv. 2010.

[33] E. Tahmasbpour, D. Balasubramanian, et A. Agarwal, « A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART) », *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 31, n° 9, p. 1115‑1137, sept. 2014.

ANNEXES

Document 1 : Fiche de renseignements clinico-biologiques

Nom : Délai d'abstinence :

Prénom :

Date de naissance : âge :

Antécédents médico-chirurgicaux :

Antécédents génito-urinaires :

Antécédents familiaux :

TAD :

Toxiques/expositions :

Profession/Mode de vie (sport, alimentation…) :

Ethnie :

Paternité (enfants nés, IVG, FCS…) :

Poids : Taille : IMC :

Spermogramme (date) :

Numération : Mobilité (a+b) : FT :

Fragmentation : SDI :

Document 2 : Protocole d'extraction de l'ADN

QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit

The QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (cat. no. 51604) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 12 months.

Further information

- *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit Handbook*: www.qiagen.com/handbooks
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: toll-free 00800-22-44-6000, or www.qiagen.com/contact

Notes before starting

- Prepare a thermomixer with 2 ml inlays or a water bath at 70°C for use in steps 3 and 8.
- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C) at 20,000 x *g* (~14,000 rpm).
- Redissolve any precipitates in Buffer AL and InhibitEX® Buffer by heating and mixing.
- Add ethanol to Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates.
- Mix all buffers before use.

Symbols: ● pathogen detection; ■ human DNA analysis

1. Weigh 180–220 mg stool in a 2 ml microcentrifuge tube (not provided) and place tube on ice.

2. Add 1 ml InhibitEX Buffer to each stool sample. Vortex continuously for 1 min or until the stool sample is thoroughly homogenized.

3. ■ Skip this step and continue with step 4. ● Heat the suspension for 5 min at 70°C. The lysis temperature can be increased to 95°C for cells that are difficult to lyse. Vortex for 15 s.

4. Centrifuge sample for 1 min to pellet stool particles.

5. Pipet ● 15 µl or ■ 25 µl Proteinase K into a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

6. Pipet ● 200 µl or ■ 600 µl supernatant from step 4 into the 1.5 ml microcentrifuge tube containing Proteinase K.

7. Add ● 200 µl or ■ 600 µl Buffer AL and vortex for 15 s. Note: Do not add Proteinase K directly to Buffer AL. It is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to form a homogeneous solution.

8. Incubate at 70°C for 10 min.

9. Add ● 200 µl or ■ 600 µl of ethanol (96–100%) to the lysate, and mix by vortexing.

10. Carefully apply 600 µl lysate from step 9 to the QIAamp spin column. Close the cap and centrifuge for 1 min. Place the QIAamp spin column in a new 2 ml collection tube, and discard the tube containing the filtrate.
■ Repeat step 10 until all of the lysate has been loaded on the column.

11. Carefully open the QIAamp spin column and add 500 µl Buffer AW1. Centrifuge for 1 min. Place the QIAamp spin column in a new 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the filtrate.

12. Carefully open the QIAamp spin column and add 500 µl Buffer AW2. Centrifuge for 3 min. Discard the collection tube containing the filtrate.

13. Place the QIAamp spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge for 3 min.

14. Transfer the QIAamp spin column into a new, labeled 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided) and pipet 200 µl Buffer ATE directly onto the QIAamp membrane. Incubate for 1 min at room temperature, then centrifuge for 1 min to elute DNA. If yield will be quantified by UV absorbance, blank the measuring device using Buffer ATE to avoid false results.

Document 3 : Plan de plaque de PCR

2	2	1	1	0,2	0,2	0,02	0,02	Blanc	Blanc	H2O	H2O
AP8	AP8	AS8	AS8	BP8	BP8	BS8	BS8	CP8	CP8	CS8	CS8
DP8	DP8	DS8	DS8	EP8	EP8	ES8	ES8				
AP10	AP10	AS10	AS10	BP10	BP10	BS10	BS10	CP10	CP10	CS10	CS10
DP10	DP10	DS10	DS10	EP10	EP10	ES10	ES10				
AP15	AP15	AS15	AS15	BP15	BP15	BS15	BS15	CP15	CP15	CS15	CS15
DP15	DP15	DS15	DS15	EP15	EP15	ES15	ES15				
primers : 2,5 µL			Pour 70 réactions :		primers : 35 µL						
SYBR Green : 12,5 µL					SYBR Green : 175 µL						
	H2O : 5 µL					H2O : 70 µL		Date : 17/04/2015			
échantillon à tester : 5 µL											

MOTS CLÉS

Assistance Médicale à la Procréation - ADN libre – cell free DNA – azoospermie – paramètres spermatiques – RT-PCR

RÉSUMÉ

Les acides nucléiques circulants sont connus depuis les années 50 et ne cessent de démontrer leurs différents potentiels diagnostic, pronostic et thérapeutique. Hormis l'intérêt oncologique de ces fragments d'ADN libre, l'Assistance Médicale à la Procréation y découvre un outil moléculaire facilement mesurable orientant la prise en charge des couples infertiles. À notre connaissance, il n'existe pas encore de données solides concernant le dosage d'ADN circulant dans le plasma séminal des hommes présentant des altérations spermatiques. Notre travail a consisté en une étude princeps démontrant la présence d'ADN libre dans le liquide séminal par dosage quantitatif par PCR en temps réel. L'analyse a inclus des patients porteurs d'anomalies spermatiques (n = 21) comparés à des témoins « sains » (n = 21). Les dosages ont montré une augmentation significative des taux d'ADN libre chez les patients atteints d'anomalies spermatiques (2,09 *vs* 1,18 µg/mL ; p = 0,0003). Ainsi qu'une augmentation significative des taux de cf-DNA chez les patients azoospermiques (3,65 *vs* 1,34 µg/mL ; p = 0,03) et tératozoospermiques (1,80 *vs* 1,29 µg/mL ; p = 0,008). Cette étude est la première à mettre en évidence un lien significatif entre une augmentation des taux d'ADN libre séminal et des altérations spermatiques et ouvre de nouvelles perspectives diagnostique et pronostique.

ABSTRACT

Circulating nucleic acids are known since the 50's and continue to demonstrate different potential diagnostic, prognostic and therapeutic. Apart from oncologic advantage of these cell-free DNA fragments, Assisted Reproductive Technology discovers an easily measurable molecular tool guiding the care of infertile couples. To our knowledge, there is no solid data on the cf-DNA assay in the seminal plasma of men with sperm alterations. Our work consisted to demonstrate the presence of cf-DNA in semen by quantitative real-time PCR. The analysis included patients with sperm abnormalities (n = 21) compared to "healthy" control (n = 21). The assays showed a significant increase in cf-DNA levels in patients with sperm abnormalities (2.09 vs 1.18 µg/mL ; p = 0.0003). And a significant increase of cf-DNA levels in azoospermic patients (3.65 vs 1.34 µg/mL ; p = 0.03) and tératozoospermics patients (1.80 vs 1.29 µg/mL ; p = 0.008). This is the first study demonstrate a significant association between increased cf-DNA levels and sperm abnormalities and opens new diagnostic and prognostic perspectives.