



**HAL**  
open science

## HE4, nouveau marqueur d'infertilité masculine ?

Célia Decondé Le Butor

► **To cite this version:**

Célia Decondé Le Butor. HE4, nouveau marqueur d'infertilité masculine?. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-02382145

**HAL Id: dumas-02382145**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02382145v1>**

Submitted on 27 Nov 2019

**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.



**THESE D'EXERCICE pour le  
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE  
D.E.S. de BIOLOGIE MEDICALE**

**Célia Decondé Le Butor**

Née le 14 septembre 1987 à Cannes

---

**HE4, un nouveau marqueur d'infertilité masculine ?**

---

Soutenue le 1<sup>er</sup> octobre 2018  
A la faculté de Médecine de Nice

Devant le Jury composé de :

**Président du Jury :**

Madame la Professeur Giulia CHINETTI

**Directrice de Thèse :**

Madame la Docteur Patricia FERRARI

**Assesseurs :**

Madame la Professeur Valérie GIORDANENGO

Monsieur le Professeur Daniel CHEVALLIER



## Liste des enseignants au 1er mars 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

### Doyen

Pr. BAQUÉ Patrick

### Vice-doyens

**Pédagogie**

Pr. ALUNNI Véronique

**Recherche**

Pr DELLAMONICA Jean

**Etudiants**

M. JOUAN Robin

**Chargé de mission projet Campus**

Pr. PAQUIS Philippe

Conservateur de la bibliothèque

Mme AMSELLE Danièle

Directrice administrative des services

Mme CALLEA Isabelle

Doyens Honoraires

M. AYRAUD Noël

M. RAMPAL Patrick

M. BENCHIMOL Daniel

## Liste des enseignants au 1er mars 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

### PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M.	AMIEL Jean	Urologie (52.04)
M.	BERNARDIN Gilles	Réanimation Médicale (48.02)
M.	BOILEAU Pascal	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M.	DARCOURT Jacques	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M.	ESNAULT Vincent	Néphrologie (52-03)
Mme	EULLER-ZIEGLER Liana	Rhumatologie (50.01)
M.	FENICHEL Patrick	Biologie du Développement et de la Reproduction (54.05)
M.	FUZIBET Jean-Gabriel	Médecine Interne (53.01)
M.	GASTAUD Pierre	Ophthalmologie (55.02)
M.	GILSON Éric	Biologie Cellulaire (44.03)
M.	HASSEN KHODJA Reda	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M.	HÉBUTERNE Xavier	Nutrition (44.04)
M.	HOFMAN Paul	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
Mme	ICHAÏ Carole	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	LACOUR Jean-Philippe	Dermato-Vénérologie (50.03)
M.	LEFTHERIOTIS Geogres	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (51.04)
M.	MARQUETTE Charles-Hugo	Pneumologie (51.01)
M.	MARTY Pierre	Parasitologie et Mycologie (45.02)
M.	MICHIELS Jean-François	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M.	MOUROUX Jérôme	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
Mme	PAQUIS Véronique	Génétique (47.04)
M.	PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)
M.	QUATREHOMME Gérald	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	RAUCOULES-AIMÉ Marc	Anesthésie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	ROBERT Philippe	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M.	SANTINI Joseph	O.R.L. (55.01)
M.	THYSS Antoine	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	TRAN Albert	Hépto Gastro-entérologie (52.01)

## Liste des enseignants au 1er mars 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

### PROFESSEURS PREMIERE CLASSE

Mme	ASKENAZY-GITTARD Florence	Pédopsychiatrie (49.04)
M.	BAQUÉ Patrick	Anatomie - Chirurgie Générale (42.01)
M.	BARRANGER Emmanuel	Gynécologie Obstétrique (54.03)
M.	BÉRARD Étienne	Pédiatrie (54.01)
Mme	BLANC-PEDEUTOUR Florence	Cancérologie – Génétique (47.02)
M.	BONGAIN André	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
Mme	BREUIL Véronique	Rhumatologie (50.01)
M.	CASTILLO Laurent	O.R.L. (55.01)
M.	DE PERETTI Fernand	Anatomie-Chirurgie Orthopédique (42.01)
M.	DRICI Milou-Daniel	Pharmacologie Clinique (48.03)
M.	FERRARI Émile	Cardiologie (51.02)
M.	FERRERO Jean-Marc	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	GIBELIN Pierre	Cardiologie (51.02)
M.	GUGENHEIM Jean	Chirurgie Digestive (52.02)
M.	HANNOUN-LEVI Jean-Michel	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	LONJON Michel	Neurochirurgie (49.02)
M.	MOUNIER Nicolas	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	PADOVANI Bernard	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	PICHE Thierry	Gastro-entérologie (52.01)
M.	PRADIER Christian	Épidémiologie, Économie de la Santé et Prévention (46.01)
Mme	RAYNAUD Dominique	Hématologie (47.01)
M.	ROSENTHAL Éric	Médecine Interne (53.01)
M.	SCHNEIDER Stéphane	Nutrition (44.04)
M.	STACCINI Pascal	Biostatistiques et Informatique Médicale (46.04)
M.	THOMAS Pierre	Neurologie (49.01)

## Liste des enseignants au 1er mars 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

### PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE

Mme	ALUNNI Véronique	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	ANTY Rodolphe	Gastro-entérologie (52.01)
M.	BAHADORAN Philippe	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	BAILLIF Stéphanie	Ophthalmologie (55.02)
M.	BENIZRI Emmanuel	Chirurgie Générale (53.02)
M.	BENOIT Michel	Psychiatrie (49.03)
M.	BREAUD Jean	Chirurgie Infantile (54-02)
M.	CHEVALIER Nicolas	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
M.	CHEVALLIER Patrick	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
Mme	CHINETTI Giulia	Biochimie-Biologie Moléculaire (44.01)
M.	CLUZEAU Thomas	Hématologie (47.01)
M.	DELLAMONICA Jean	réanimation médicale (48.02)
M.	DELOTTE Jérôme	Gynécologie-obstétrique (54.03)
M.	FONTAINE Denys	Neurochirurgie (49.02)
M.	FOURNIER Jean-Paul	Thérapeutique (48-04)
Mlle	GIORDANENGO Valérie	Bactériologie-Virologie (45.01)
M.	GUÉRIN Olivier	Gériatrie (48.04)
M.	IANNELLI Antonio	Chirurgie Digestive (52.02)
M	JEAN BAPTISTE Elixène	Chirurgie vasculaire (51.04)
M.	LEVRAUT Jacques	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	PASSERON Thierry	Dermato-Vénérologie (50-03)
M.	ROGER Pierre-Marie	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M.	ROHRLICH Pierre	Pédiatrie (54.01)
M.	ROUX Christian	rhumatologie (50.01)
M.	RUIMY Raymond	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme	SACCONI Sabrina	Neurologie (49.01)
M.	SADOUL Jean-Louis	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
M.	TROJANI Christophe	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)

## Liste des enseignants au 1er mars 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

### MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

M.	AMBROSETTI Damien	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	BANNWARTH Sylvie	Génétique (47.04)
M.	BENOLIEL José	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme	BERNARD-POMIER Ghislaine	Immunologie (47.03)
M.	BRONSARD Nicolas	Anatomie Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (42.01)
Mme	BUREL-VANDEBOS Fanny	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	DOGLIO Alain	Bactériologie-Virologie (45.01)
M	DOYEN Jérôme	Radiothérapie (47.02)
M	FAVRE Guillaume	Néphrologie (52.03)
M.	FOSSE Thierry	Bactériologie-Virologie-Hygiène (45.01)
M.	GARRAFFO Rodolphe	Pharmacologie Fondamentale (48.03)
Mme	GIOVANNINI-CHAMI Lisa	Pédiatrie (54.01)
Mme	HINAULT Charlotte	Biochimie et biologie moléculaire (44.01)
M.	HUMBERT Olivier	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme	LAMY Brigitte	Bactériologie-virologie ( 45.01)
Mme	LEGROS Laurence	Hématologie et Transfusion (47.01)
Mme	LONG-MIRA Elodie	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	MAGNIÉ Marie-Noëlle	Physiologie (44.02)
Mme	MOCERI Pamela	Cardiologie (51.02)
Mme	MUSSO-LASSALLE Sandra	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	NAÏMI Mourad	Biochimie et Biologie moléculaire (44.01)
Mme	POMARES Christelle	Parasitologie et mycologie (45.02)
Mme	SEITZ-POLSKI barbara	Immunologie (47.03)
M.	TESTA Jean	Épidémiologie Économie de la Santé et Prévention (46.01)
M.	TOULON Pierre	Hématologie et Transfusion (47.01)

## Liste des enseignants au 1er mars 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

### PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS

M. HOFLIGER Philippe Médecine Générale (53.03)

### MAITRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS

M. DARMON David Médecine Générale (53.03)

### PROFESSEURS AGRÉGÉS

Mme LANDI Rebecca Anglais

### PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

M. DURAND Matthieu Urologie (52.04)

M. ILIE Marius Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)

### PROFESSEURS ASSOCIÉS

M. GARDON Gilles Médecine Générale (53.03)

Mme HURST Samia Thérapeutique (48.04)

M. PAPA Michel Médecine Générale (53.03)

### MAITRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

M BALDIN Jean-Luc Médecine Générale (53.03)

Mme CASTA Céline Médecine Générale (53.03)

M. HOGU Nicolas Médecine Générale (53.03)

Mme MONNIER Brigitte Médecine Générale (53.03)

## Liste des enseignants au 1er mars 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

### Constitution du jury en qualité de 4ème membre

#### Professeurs Honoraires

M ALBERTINI Marc	M. GILLET Jean-Yves
M. BALAS Daniel	M. GRELLIER Patrick
M. BATT Michel	M. GRIMAUD Dominique
M. BLAIVE Bruno	M. HARTER Michel
M. BOQUET Patrice	M. JOURDAN Jacques
M. BOURGEON André	M. LAMBERT Jean-Claude
M. BOUTTÉ Patrick	M. LAZDUNSKI Michel
M. BRUNETON Jean-Noël	M. LEFEBVRE Jean-Claude
Mme BUSSIERE Françoise	M. LE FICHOUX Yves
M. CAMOUS Jean-Pierre	Mme LEBRETON Elisabeth
M. CANIVET Bertrand	M. LOUBIERE Robert
M. CASSUTO Jill-patrice	M. MARIANI Roger
M. CHATEL Marcel	M. MASSEYEFF René
M. COUSSEMENT Alain	M. MATTEI Mathieu
Mme CRENESSE Dominique	M. MOUIEL Jean
M. DAR COURT Guy	Mme MYQUEL Martine
M. DELLAMONICA Pierre	M. ORTONNE Jean-Paul
M. DELMONT Jean	M. PRINGUEY Dominique
M. DEMARD François	M. SAUTRON Jean Baptiste
M. DESNUELLE Claude	M. SCHNEIDER Maurice
M. DOLISI Claude	M. TOUBOL Jacques
M. FRANCO Alain	M. TRAN Dinh Khiem
M. FREYCHET Pierre	M VAN OBBERGHEN Emmanuel
M. GÉRARD Jean-Pierre	M. ZIEGLER Gérard

#### M.C.U. Honoraires

M. ARNOLD Jacques	M. GIUDICELLI Jean
M. BASTERIS Bernard	M. MAGNÉ Jacques
Mlle CHICHMANIAN Rose-Marie	Mme MEMRAN Nadine
Mme DONZEAU Michèle	M. MENGUAL Raymond
M. EMILIOZZI Roméo	M. PHILIP Patrick
M. FRANKEN Philippe	M. POIRÉE Jean-Claude
M. GASTAUD Marcel	Mme ROURE Marie-Claire

## Remerciements

**A Madame la Professeur Giulia CHINETTI**, vous me faites l'honneur de présider ce Jury. Merci de votre écoute et de votre attention pour suivre mes premiers pas en tant qu'assistante dans ce laboratoire. J'espère à l'avenir vous apporter entière satisfaction.

**A Madame la Professeur Valérie GIORDANENGO**, je vous remercie d'avoir encore une fois répondu présente lors de ma sollicitation pour participer à ce Jury. Valérie, je vous remercie pour tout le temps que vous m'avez accordé durant mon internat ; pour vos conseils toujours avisés et donnés avec la plus grande bienveillance ; pour votre infaillible soutien. Merci également pour ces moments privilégiés passés à vos côtés, qu'ils soient encore nombreux. Soyez assurée de mon affection la plus sincère.

**A Monsieur le Professeur Daniel CHEVALLIER**, je vous remercie de me faire l'honneur de juger cette thèse. Nous ne nous connaissions pas avant aujourd'hui mais il me semblait indispensable que ce travail soit jugé par un andrologue. Je vous remercie d'être là aujourd'hui et de représenter cette spécialité encore trop peu connue.

**A Madame le Docteur Patricia FERRARI**, je te remercie d'avoir accepté de diriger ma thèse et de m'avoir accordé ta confiance pour mener à bien ce travail. Merci d'avoir été là pour me conseiller et me soutenir, car oui, quoi que tu en dises tu as été présente, tu étais là, chaque jour, au moins dans mon cœur. Merci de m'avoir enseigné l'hormonologie et ainsi m'avoir donné goût à cette spécialité. Merci d'avoir suivi la progression de mon internat et de m'avoir ouvert tant de portes. J'espère pouvoir faire honneur à l'espace que tu me laisses au sein du laboratoire.

A ma p'tite maman, merci de m'avoir obligée à faire Médecine, sans ton opiniâtreté je n'en serais pas là aujourd'hui ; merci de m'avoir faite ainsi, de m'avoir fait devenir ce que je suis, même si y'a des défauts, finalement c'est pas si mal...

A mes grands-parents, ma mémé Angélines, qui n'est plus là aujourd'hui mais à qui je pense, et mon pépé René. Merci pour toute cette enfance au cours de laquelle vous avez été tant présents, pour cette cabane au milieu du jardin, pour ces vadrouilles estivales au cœur de la Seine-et-Marne ou de la Normandie et tous ces repas dominicaux.

A mon parrain Nicolas et à ma tante Elisabeth, merci d'avoir gardé un œil attentif et tant attentionné sur moi.

A ma cousine Héloïse, presque ma petite sœur, toujours petite à mes yeux mais tellement grande en réalité, je suis fière de toi ma belle.

A mon papa, merci de tous ces weekends, de ces sorties en tous genres, de tout ce que tu m'as fait découvrir. Je pense que c'est à toi que je dois ma capacité d'adaptation.

A la famille Beaudoin, pour la confiance qu'elle m'accorde, merci de m'avoir si bien accueillie et intégrée.

A mes copinettes, celles que j'ai le plaisir de voir régulièrement, Agnès, Steph, Laura, Coralie, Axelle, Emilie et celles que je vois moins mais qui sont quand même dans mon cœur Camillette, Audrey 3G, Audrey DD, Olivia, Didine, Camille B, Audrey G, Bérengère, Axou, Caroline, Titou, Poubie. Vous êtes des amies en or, j'ai beaucoup de chance de vous connaître.

Aux copains, ceux qui sont là Fredo, Auré, Kiko, Manu, Damien, Dibar, César, Beethov, JB et ceux qui se sont expatriés plus ou moins loin Baptou, Seb, Antho, Pierrot, Maxou, Jeff.

Aux copains que je connais depuis 3 ans, Orel, Djé, Marion et Juju.

A mes co-internes, les piou-pious, Mathilde B, Caro, Stéphane, Loïc S, Lamine, Lydie, Yuta, Mathilde V, Jacques, MP, Loïc R ; à celles qui sont déjà grandes, Anne, Morgane et Juliette ; et les p'ti nouveaux Alicia, Mathilde V, on n'aurait pas pu rêver mieux comme équipe ! Vous êtes au top, j'vous adore !

A toute l'équipe du laboratoire d'hormonologie et du PTPP du GHE de Lyon. Merci d'avoir fait de mon inter-CHU une expérience si enrichissante, tant au niveau humain que professionnel.

A Pascale, merci pour ton encadrement, pour les réponses à toutes mes questions et pour tout ce que tu m'as appris.

Aux techniciens du labo d'hormono, à ceux du labo de bioch et à ceux qui transitent entre les deux, aux techniciens d'hémato avec qui on rigole bien le midi et tous ceux des autres labos, à nos cadres et nos secrétaires, à tous les biologistes qui m'ont transmis une part de leur savoir, et à vous tous ici présents, ...

Si vous avez été conviés ce soir c'est parce que chacun d'entre vous a participé à ma formation, chacun d'entre vous a rendu mon internat plus intéressant. Grâce à vous j'ai passé 5 très belles années. Grâce à vous je sais aujourd'hui que ce métier est fait pour moi. Merci !

A Olivier, mon amoureux, merci pour ton infinie patience, ton amour inconditionnel, tes innombrables attentions, ... Je te vois prendre le soin chaque jour de veiller à mettre un peu plus d'étoiles dans mes yeux et encore plus de bonheur dans mon cœur. Merci à la vie de m'avoir fait croiser ton chemin. A notre avenir ensemble qui s'annonce être plein de promesses.

## Résumé

**Introduction :** L'infertilité est un motif fréquent de recours aux professionnels de santé. Dans 20% des cas, seul l'homme est en cause. Certaines infertilités, étiquetées idiopathiques, pourraient être liées à des anomalies de la maturation moléculaire des spermatozoïdes. HE4 a été découvert dans la partie distale de l'épididyme, organe connu pour être un lieu de maturation des spermatozoïdes où ils acquièrent leur mobilité et leur pouvoir fécondant. Le dosage sérique d'HE4 utilisant une méthode simple, robuste et assez peu coûteuse, pourrait être appliqué en pratique clinique courante dans l'exploration de l'infertilité masculine. L'objectif principal de notre étude était de déterminer si les valeurs sériques d'HE4 étaient différentes chez les patients ayant des altérations des paramètres spermatiques par rapport aux hommes ayant un spermogramme normal.

**Matériels et méthodes :** Il s'agit d'une étude monocentrique, observationnelle, cas-témoin comparant un groupe d'hommes ayant au moins une anomalie du spermogramme, les « cas », à un groupe « témoin » d'hommes avec un spermogramme normal appariés sur l'âge. Les critères d'inclusion étaient tout homme âgé de 18 à 50 ans, consultant au centre de procréation médicalement assistée du CHU de Nice. La concentration sérique d'HE4 était déterminée par une méthode de dosage manuelle EIA distribuée par Fujirebio Diagnostics, Göteborg, Suède.

**Résultats :** Entre juillet 2017 et avril 2018, nous avons inclus 120 patients. La concentration sérique moyenne d'HE4 des « cas » n'était pas différente de celle du groupe « témoin » (respectivement  $45.87 \pm 22.71$  pmol/l et  $44.12 \pm 15.42$  pmol/l ;  $p=0.6233$ ). Néanmoins, il a été observé une différence significative entre la valeur sérique moyenne d'HE4 chez les patients ayant une mobilité progressive a+b à 1h inférieure à 30% et celle chez ceux ne présentant pas d'asthénospermie (respectivement  $54.8 \pm 23.54$  pmol/l et  $42.94 \pm 15.87$  pmol/l ;  $p=0.0441$ ).

**Conclusion :** Notre étude ne nous a pas permis de mettre en évidence un nouvel outil diagnostique dans l'exploration de l'infertilité masculine mais il serait intéressant d'approfondir l'étude du lien entre HE4 et l'asthénospermie.

**Mots-clés :** HE4, infertilité masculine, épидидyme, asthénospermie

## Abstract

**Introduction :** Infertility is a common reason for asking health professionals. In 20% of cases, only the man is involved. Some infertilities, labelled idiopathic, could be due to abnormalities in sperm molecular maturation. HE4 has been discovered in the distal part of the epididymis, an organ known to be involved in sperm maturation where spermatozoa acquire their mobility and their fertilizing abilities. HE4 assay using a simple, robust and not expensive method could be applied in routine clinical practice to explore male infertility. The main aim of this study was to determine whether patients with abnormal sperm parameters had different HE4 serum levels than men with normal seminograms.

**Materials and methods :** This is an observational case-control study. It compares a group of men with at least one sperm impairment, the "cases", to a "control" group of men with a normal seminogram paired on age. We included every man from 18 to 50 years-old consulting in Reproductive Medicine Unit of the University Hospital of Nice. HE4 serum level was determined with EIA assay distributed by Fujirebio Diagnostics, Gothenburg, Sweden.

**Results :** Between July 2017 and April 2018, we included 120 patients. The HE4 mean serum value of the "cases" was not different from that of the "control" group (respectively 45.87 +/- 22.71 pmol/l and 44.12 +/- 15.42 pmol/l,  $p = 0.6233$ ). Nevertheless, there was a significant difference between the mean HE4 value in patients with less than 30% progressive mobility and those without asthenozoospermia (respectively 54.8 +/- 23.54 pmol/l and 42.94 +/- 15.87 pmol/l,  $p = 0.0441$ ).

**Conclusion :** With our study we do not discover a new diagnostic tool to explore male infertility but it would be interesting to investigate the link between HE4 and asthenozoospermia.

**Key words :** HE4, male infertility, epididymis, asthenozoospermia

# Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>14</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>18</b>
1. Infertilité.....	19
a. Définitions.....	19
b. Evolution des paramètres spermatiques.....	19
c. Evolution des normes OMS.....	20
2. Epididyme.....	20
3. HE4.....	21
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>22</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>23</b>
1. Caractéristiques de la population.....	23
2. Déroulement de l'étude.....	23
3. Méthodes de dosage.....	24
a. HE4.....	24
b. Autres paramètres sériques.....	24
c. Spermogramme.....	25
4. Analyses statistiques.....	25
<b>RESULTATS.....</b>	<b>26</b>
1. Description des groupes.....	26
2. Réponse à l'objectif principal.....	27
3. Réponses aux objectifs secondaires.....	28
a. Paramètres spermatiques.....	28
i. Numération.....	28
ii. Mobilité.....	28
iii. Morphologie.....	29
b. Paramètres sériques : Gonadotrophines, inhibine B et testostérone.....	29
c. Autres paramètres clinico-biologiques.....	29
i. Tabagisme.....	29
ii. Age des patients.....	30
iii. La créatininémie.....	31
iv. L'IMC.....	31
d. Etablissement de valeurs de références.....	31
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>33</b>
1. Exposition du résultat principal.....	33
2. Validité externe : confrontation aux données de la littérature.....	33
a. Les cancers.....	33
b. La fonction rénale.....	33
c. L'âge.....	34
d. Le tabac.....	34
e. L'IMC.....	34
3. Discussion des données non significatives ou divergentes.....	34
4. Validité interne : exposition des biais et des limites de l'étude.....	35
5. Indication des points forts des résultats : association HE4 et asthénospermie.....	35
6. Conclusion et perspectives de travail.....	36
<b>Bibliographie.....</b>	<b>37</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>39</b>
<b>Serment d'Hippocrate.....</b>	<b>48</b>

## Figures & Tableaux

Tableau 1 : Description clinico-biologique de la population étudiée

Figure 1 : Les valeurs d'HE4 sont plus élevées chez les patients ayant une asthénospermie

Figure 2 : Les valeurs d'HE4 sont plus élevées chez les patients fumeurs

Figure 3 : Les valeurs d'HE4 sont plus élevées chez les patients les plus âgés

Figure 4 : Courbe de distribution des valeurs d'HE4 chez les patients âgés de 18 à 50 ans

## Liste des abréviations

AMP : Assistance médicale à la procréation

CA125 : Cancer Antigen 125

CECOS : Centres d'étude et de conservation des œufs et du sperme

CHU : Centre hospitalier universitaire

CPP : Comité de protection des personnes

DRCI : Délégation de la recherche clinique et de l'innovation

EIA : Enzyμο Immuno Assay

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FSH : Follicle Stimulating Hormone, hormone folliculo-stimulante

HE4 : Human epididymis protein 4

IMC : Indice de masse corporelle

LH : Luteinizing Hormone, hormone lutéinisante

PMA : Procréation médicalement assistée

REG : Réticulum endoplasmique granuleux

ROMA : Risk of Ovarian Malignancy Algorithm

TMS : Test de migration-survie

WAP : Whey acidic protein

WFDC : WAP-type four disulfide core

# Introduction

## 1. Infertilité

### a. Définitions

Si elle n'est pas vitale pour un individu, la fertilité est nécessaire à la pérennité de l'espèce. Elle se définit comme la capacité d'un individu à concevoir un enfant. Cette notion, difficilement quantifiable, peut néanmoins être approchée par des indicateurs tels que le délai nécessaire pour concevoir une grossesse ou l'infécondité involontaire. Cette dernière est définie par l'absence de grossesse chez un couple ayant des rapports sexuels sans contraception suite à une période de temps donnée (par exemple 6, 12 ou 24 mois). Au milieu des années 2000, les données de l'Observatoire épidémiologique de la fertilité française ont permis d'estimer que 6 mois après le début d'une période sans contraception, 46% des couples n'avaient pas obtenu de grossesse (IC95% : 36-56%)(1). Ces proportions étaient respectivement de 24% (IC95% : 19-30%) et 11% (IC95% : 8-14%) au bout de 12 et 24 mois (2). Passé un délai de 48 mois, environ 5% des couples seront considérés comme stériles (3). Chaque année, en France, près de 15% des couples consultent dans un centre d'assistance médicale à la procréation (AMP). Au sein d'un couple les causes d'infertilité sont attribuables uniquement à la femme dans 38% des cas, uniquement à l'homme dans 20% des cas et aux deux membres du couple dans 34% des cas. Cependant, dans 8 % des cas, aucune cause n'est retrouvée (4,5). Chez l'homme, cinq grands mécanismes d'altération de la fertilité sont identifiés : les troubles érectiles, éjaculatoires et sexuels, les causes endocriniennes, les causes testiculaires, les obstructions des voies séminales et les altérations morphologiques et fonctionnelles des spermatozoïdes. Il est fréquent d'observer plusieurs facteurs d'infertilité chez un même patient. Certaines infertilités masculines restent néanmoins étiquetées idiopathiques, et pourraient bien être liées à des anomalies de la maturation moléculaire des spermatozoïdes (6).

### b. Evolution des paramètres spermatiques :

En France, plusieurs équipes se sont impliquées dans la recherche clinico-épidémiologique sur la santé reproductive de l'homme. En 2012 le bulletin épidémiologique hebdomadaire a fait le point sur les variations séculaires des caractéristiques du sperme humain. Deux grandes études ont été menées dans les CECOS (centres d'étude et de conservation des œufs et du sperme) sur les caractéristiques du sperme des candidats au don. La première, menée par le CECOS de Paris-Bicêtre entre 1973 et 1992, décrivait une baisse significative de la concentration de spermatozoïdes, de

l'ordre de 2,1% par an, passant de  $89 \times 10^6/\text{ml}$  en 1973 à  $60 \times 10^6/\text{ml}$  en 1992. Il existait aussi une diminution significative du pourcentage de spermatozoïdes mobiles et du pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux (7). Cette tendance a été confirmée par une deuxième étude, réalisée au sein du CECOS de Tours entre 1976 et 2009. Celle-ci faisait en plus le constat d'une diminution du pourcentage de spermatozoïdes vivants, passant de 88 à 80% (8).

### c. Evolution des normes OMS :

Actuellement, les normes des paramètres spermatiques, évalués au cours d'un spermogramme, sont établies au niveau international suite à une étude portant sur plusieurs milliers d'hommes fertiles publiée par l'OMS en 2010. Dans cette dernière version du référentiel, ces normes ont été revues à la baisse par rapport à l'ancienne version datant de 1999. Désormais, le volume de l'éjaculat est considéré comme normal à partir de 1.5 ml alors qu'il devait être  $>2$  ml en 1999. Par ailleurs, on parlait d'oligospermie dès que la concentration en spermatozoïdes était inférieure à 20 millions/ml en 1999 ; aujourd'hui la valeur minimale considérée comme normale est 15 millions/ml. De même, on parle aujourd'hui d'asthénospermie en dessous de 32% de spermatozoïdes mobiles alors qu'en 1999 la norme était fixée à 50%. Seule la valeur de la proportion de spermatozoïdes vivant a été revue à la hausse ( $> 50\%$  en 1999 vs  $> 58\%$  en 2010).

## 2. L'épididyme

L'épididyme est un organe bilatéral intra-scrotal posé sur le bord latéro-postérieur de chaque testicule. Il est fait d'un canal extrêmement convolutif, mesurant près de 6 mètres. Ce canal épидидymaire est un épithélium prismatique pseudo-stratifié formé par les cellules principales qui possèdent des organites impliqués dans la synthèse protéique (REG et Golgi). Ces cellules sont munies de stéréocils qui aident à la progression des spermatozoïdes. Chez l'homme, le temps du transport épидидymaire des spermatozoïdes, continuellement produits par les testicules, dure entre 2 et 6 jours.

L'épididyme se découpe en trois zones fonctionnellement différentes qui se font suite : la tête, le corps et la queue. Au cours de leur transit épидидymaire les spermatozoïdes rencontrent des environnements variés. Chacune des trois zones présente une signature protéomique distincte

participant à la maturation des spermatozoïdes. A l'issue de ce transport, les spermatozoïdes atteignent la queue de l'épididyme où ils sont stockés entre deux éjaculations (9,10).

### 3. HE4

Human epididymis protein 4 (HE4) a d'abord été identifiée par Northern blot dans la partie distale de l'épididyme et dans le canal déférent humain (11). Le gène situé sur le chromosome 20q13, connu sous le nom de WFDC2 ou WAP5 (Whey acidic protein), est composé de 6 exons et code pour une protéine avec un domaine WAP-type four disulfide core (WFDC)(12,13). Sa séquence peptidique est riche en cystéines et présente les caractéristiques d'une protéine sécrétée puisqu'elle possède un peptide signal (9). Même si son rôle physiologique n'est pas exactement connu, il a été démontré que le domaine WFDC d'HE4 pouvait se lier à de nombreuses protéases parmi lesquelles : trypsine, chymotrypsine, PSA, protéinase K, papaïne et pepsine et qu'elle exerce sur chacune d'entre elles une action inhibitrice dose-dépendante (13,14).

Actuellement, le taux sérique d'HE4 est utilisé comme marqueur diagnostique des tumeurs malignes de l'ovaire (15). L'algorithme ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) prenant en compte le statut ménopausique de la patiente ainsi que les valeurs d'HE4 et de CA125 a été développé pour estimer le risque de cancer épithélial ovarien face à une masse annexielle, ce qui est une situation clinique assez fréquente chez la femme en péri-ménopause(16).

La concentration sérique d'HE4 ne semble pas évoluer selon un rythme circadien et n'est influencée ni par les saisons, ni par le jeûne ou le post-prandial, ni par la consommation d'alcool, ni par l'activité physique, ni par l'IMC (17). Les patients atteints d'une épididymite aigüe n'ont pas une valeur sérique d'HE4 différente des hommes du même âge et le traitement de l'épididymite ne modifie pas la valeur sérique de HE4 (18). En revanche, HE4 est augmentée chez les patients insuffisants rénaux, chez les fumeurs et dans certaines affections cancéreuses touchant notamment l'ovaire, le poumon ou le pancréas (17,19,20).

## Objectifs

L'infertilité est un motif fréquent de recours aux professionnels de santé. Les causes précises responsables des altérations des paramètres spermatiques restent parfois sans explication. Dans ce contexte, il semble essentiel de développer des outils diagnostiques d'exploration de la fonction de reproduction. HE4, de par sa physiologie, pourrait être intéressante dans ce domaine. Son dosage sérique utilisant une méthode simple, robuste et assez peu coûteuse, pourrait être appliqué en pratique clinique courante.

L'objectif principal de notre étude était de déterminer si les valeurs sériques d'HE4 sont différentes chez les patients ayant des altérations des paramètres spermatiques par rapport aux hommes ayant un spermogramme normal.

Les objectifs secondaires étaient les suivants :

- Valider la pertinence scientifique de l'étude en s'appuyant sur les données de la littérature
- Trouver des corrélations entre HE4 et les anomalies spermatiques constatées
- Trouver des corrélations entre HE4 et d'autres marqueurs sériques de l'axe gonadotrope
- Établir des valeurs de références dans la population masculine

## Matériels et méthodes

Il s'agit d'une étude monocentrique, observationnelle, cas-témoin comparant un groupe d'hommes ayant au moins une anomalie du spermogramme à un groupe d'hommes avec un spermogramme normal.

### 1. Caractéristiques de la population :

Les critères d'inclusion étaient tout homme d'âge compris entre 18 et 50 ans, consultant au centre de procréation médicalement assistée (PMA) du CHU de Nice, Hôpital Archet 2, entre juillet 2017 et avril 2018.

Les critères de non inclusion étaient un âge inférieur à 18 ans ou supérieur à 50 ans, l'existence d'un cancer évolutif ou d'un antécédent de cancer et/ou de radio-chimiothérapie et l'insuffisance rénale chronique (définie par créatininémie  $>120\mu\text{mol/l}$ ).

### 2. Déroulement de l'étude :

Dans le cadre de leur prise en charge, les patients réalisaient un spermogramme au laboratoire de biologie de la reproduction du CHU de Nice, Hôpital Archet 2. Leurs données démographiques, anthropomorphiques et cliniques étaient collectées dans le même temps par les médecins du centre. Un bilan sanguin était prélevé sur tube BD Vacutainer® avec gel séparateur et activateur de la coagulation. Il comprenait les dosages de FSH, LH, Testostérone et Inhibine B qui ont été réalisés au laboratoire d'hormonologie du CHU de Nice, Hôpital Pasteur 1. Le surplus de sérum disponible était conservé dans une sérothèque officielle à  $-80^{\circ}\text{C}$  déclarée auprès de la DRCI du CHU de Nice. La constitution de cette sérothèque dénommée « peptides gonadiques » a reçu l'avis favorable du comité de protection des personnes Sud Méditerranée (Annexe 1).

Par la suite, une lettre de non opposition (Annexe 2) était adressée à chaque patient en deux exemplaires dont l'un était à nous retourner complété et signé grâce à une enveloppe réponse fournie. La collecte des données biologiques a été réalisée par extraction à partir du logiciel de laboratoire Glims8. Les données cliniques et les paramètres spermatiques ont quant à eux été collectés sur le logiciel Médifirst. Les patients ont été inclus puis classés en deux groupes, « cas »

versus « témoins » appariés selon leur âge. Les valeurs de créatininémie ont été mesurées au laboratoire de Biochimie du CHU de Nice, Hôpital Pasteur 1, afin de s'assurer qu'aucun patient n'était atteint d'insuffisance rénale. Enfin, le dosage de notre protéine d'intérêt a été réalisé au sein du laboratoire d'hormonologie précédemment cité.

### 3. Méthodes de dosage :

#### a. HE4

La méthode utilisée afin de déterminer la concentration d'HE4 dans les échantillons sériques des patients que nous avons inclus est une méthode de dosage manuelle EIA distribuée par Fujirebio Diagnostics, Göteborg, Suède. Cet immuno-essai est une méthode sandwich, non compétitive, en phase solide qui utilise un couple d'anticorps monoclonaux : 2H5 comme anticorps de capture et 3D8 comme anticorps de détection, dirigés contre deux épitopes du domaine WFDC de la protéine HE4. (protocole opératoire en Annexe 3). L'absorbance de la solution finale est lue à 405 nm par spectrophotométrie. L'intensité de la couleur jaune est proportionnelle à la quantité d'HE4 présente dans chaque échantillon. Le fournisseur déclare une linéarité du test jusqu'à 900 pmol/l, une limite de détection de 15 pmol/l et un coefficient de variation <15%. Les limites de la gamme d'étalonnage s'étendaient de 28 pmol/l à 829 pmol/l pour le lot utilisé. Deux contrôles internes de qualité assuraient la validité de chaque kit de dosage, leurs coefficients de variation étaient de 10.76% et 9.05% pour des valeurs moyennes respectivement de 35.5 pmol/l et 334.3 pmol/l.

#### b. Autres paramètres sériques

Les valeurs de FSH, LH et Testostérone étaient mesurées par chimiluminescence sur automate ADVIA Centaur XPT de Siemens Healthcare, Tarrytown, USA. La créatinine était mesurée par une méthode enzymatique sur le module c701 de l'automate Cobas C8000 de Roche/Hitachi, Indianapolis, USA. L'inhibine B était quant à elle dosée manuellement par un immuno-essai de type ELISA, fourni par Anshlab, Frankfort, Allemagne.

### c. Spermogramme

Les spermogrammes ont été réalisés selon les recommandations de l'OMS de 2010 après un délai d'abstinence compris entre 2 et 5 jours.

#### 4. Analyses statistiques :

Le nombre de sujets nécessaires a été estimé, grâce à l'outil en ligne BiostatTGV de la faculté Pierre et Marie Curie, à 100 patients soit 50 dans chaque groupe. Ce nombre prenait en compte la nécessité d'un risque alpha de 5% et d'une puissance de 80%. Nous avons majoré ce recrutement afin de couvrir l'éventualité de non réponse ou de refus de participer à l'étude. Les analyses statistiques étaient réalisées grâce aux logiciels Microsoft Excel 97-2003 et GraphPad Prism 5. Les variables dont la distribution suit une loi normale sont exprimées en moyenne +/- écart-type. Le test paramétrique de Student a été utilisé pour les comparaisons des groupes de patients. Les coefficients de corrélation ont été calculés grâce au test paramétrique de Pearson. Pour l'ensemble des comparaisons, une valeur de  $p < 0.05$  est considérée comme significative.

# Résultats

## 1. Description des groupes :

Nous avons initialement sélectionné un panel de 160 patients ayant consulté au centre de PMA du CHU de Nice et ayant réalisé dans le même temps un spermogramme et un bilan sanguin. Après élimination des patients présentant au moins un critère de non inclusion ou exprimant leur refus de participer à l'étude, nous avons finalement établi une cohorte de 120 patients répartis en deux groupes. Le groupe de « cas » est composé de 61 patients ayant au moins une anomalie du spermogramme. Le groupe « témoin », composé de 59 patients avec un spermogramme normal, est apparié sur l'âge.

Parmi les 61 « cas » présentant au moins une anomalie du spermogramme, 24 avaient une oligospermie extrême (visualisation de quelques spermatozoïdes à l'examen direct) ou une cryptozoospermie (absence de spermatozoïdes à l'examen direct mais visualisation de quelques spermatozoïdes sur le culot de centrifugation) ou une azoospermie (absence de spermatozoïdes à l'examen direct et sur culot de centrifugation sur deux spermogrammes différents réalisés à 3 mois d'intervalle). Pour ces 24 patients l'étude des paramètres spermatiques était donc impossible. Dans notre groupe de « cas » 9 autres patients présentaient une oligospermie, définie par une numération  $< 39$  M/Ej ; deux de plus présentaient eux aussi une oligospermie (numération  $< 15$  M/ml) mais elle était corrigée par le volume. Parmi les 37 patients pour qui il était possible d'évaluer les paramètres spermatiques, 17 avaient une asthénospermie ( $< 32\%$  de spermatozoïdes mobiles à 1h) et 33 présentaient une tératospermie ( $< 4\%$  de spermatozoïdes dont les critères morphologiques répondent à la classification de Kruger). La description des autres paramètres clinico-biologiques est présentée dans le Tableau 1.

	Cas		Témoins		
Effectif	61		59		
	Moyenne +/-ET	Min-Max	Moyenne +/-ET	Min-Max	Valeur de p
Age (ans)	35.5 +/-6.1	23-47	35.0 +/- 5.5	22-48	0.6929
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24.9 +/- 3.1	17.8-34.0	25.1 +/- 3.6	19.4-37.2	0.7926
Créatininémie (μmol/l)	87 +/- 12	65-118	88 +/- 11	65-113	0.4964
Tabagisme	24 fumeurs	37 non fumeurs	28 fumeurs	31 non fumeurs	ns
FSH (UI/L)	10.8 +/-9	1.9-57.9	4.6 +/- 3	1-16.6	<0.0001
LH (UI/L)	5.3 +/-3.9	0.8-27.5	3.2 +/-1.2	1-6.5	0.0001
Testostérone (μg/l)	4.3 +/-2	0.8-9.4	4.6 +/-1.6	1.9-11.6	0.4410
Inhibine B (pg/ml)	120.7 +/-84.2	4.6-352	206.7 +/-86.7	57-399	<0.0001
Effectif	37		59		
Volume (ml)	3.2 +/-1.4	1-6.6	3.4 +/-1.2	1-6	0.3018
Numération (M/ml)	43.6 +/-43.4	2.2-183.2	107.9 +/-88.9	15.2-339.5	<0.0001
Numération (M/Ej)	136.6 +/-170.1	6-715.6	374.5 +/- 309	46.5-1212	0.0003
Mobilité a+b à 1h (%)	37 +/- 18	0-70	59 +/-12	32-82	<0.0001
Formes typiques selon Kruger (%)	2 +/-1	1-6	6 +/-2	4-12	<0.0001

**Tableau 1 : Description clinico-biologique de la population étudiée**

Nos deux groupes étaient donc comparables sur l'âge, l'IMC, la créatininémie et la proportion de fumeurs. Ils étaient par contre significativement distincts sur les paramètres sériques (hormis la Testostérone) ainsi que sur les paramètres spermatiques (hormis le volume).

## 2. Réponse à l'objectif principal :

Nous avons comparé les valeurs d'HE4 de nos deux groupes. Les patients ayant au moins une anomalie du spermogramme ont un taux sérique moyen d'HE4 de 45.87 +/-22.71 pmol/l. Les patients ayant un spermogramme normal ont quant à eux un taux sérique moyen d'HE4 de 44.12 +/-15.42 pmol/l. Le test T de Student ne montre aucune différence significative entre ces deux valeurs p=0.6233.

### 3. Réponses aux objectifs secondaires :

#### a. Paramètres spermatiques :

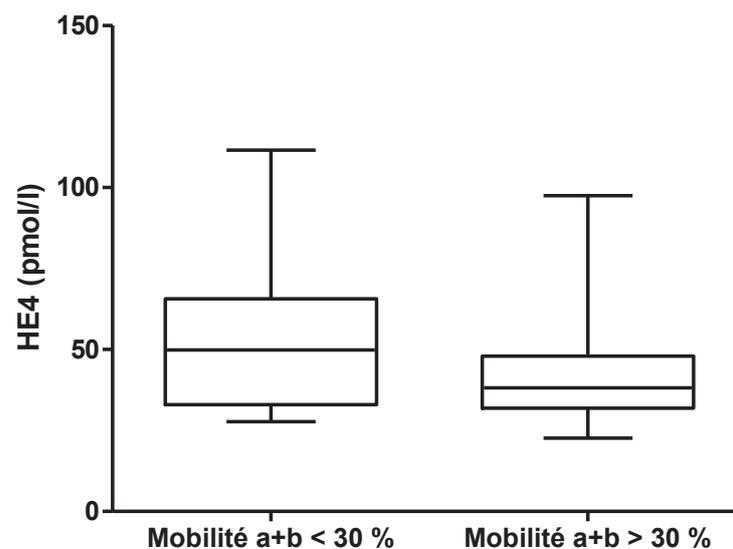
##### i. Numération

L'oligospermie est définie par une numération  $< 15$  M/ml ou  $< 39$  M/Ej. Les 35 Patients ayant moins de 15 M/ml de spermatozoïdes avaient une valeur moyenne d'HE4 de  $48.89 \pm 26.40$  pmol/l ce qui n'est pas significativement différent des 85 patients ( $n=120-35$ ) avec plus de 15 M/ml de spermatozoïdes ( $43.41 \pm 15.58$  pmol/l ;  $p=0.1607$ ) ; ni des 59 « témoins » ayant un spermogramme normal ( $44.12 \pm 15.42$  pmol/l ;  $p=0.2708$ ). De même, il n'a pas été observé de différence significative entre les 24 patients pour qui il était impossible d'évaluer les paramètres spermatiques (valeur moyenne d'HE4 de  $49.16 \pm 27.51$  pmol/l) et les « témoins » avec un spermogramme normal ( $p=0.2925$ ). Les 33 patients ayant moins de 39 M/Ej de spermatozoïdes n'ont pas un taux d'HE4 différent des 87 ( $n=120-33$ ) patients avec plus de 39 M/Ej de spermatozoïdes ( $50.27 \pm 27.02$  pmol/l vs  $43.02 \pm 15.34$  pmol/l ;  $p=0.675$ ) et des patients avec un spermogramme normal  $p=0.1674$ .

D'autre part, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les valeurs d'HE4 et la numération ( $R^2=0.0001409$ ).

##### ii. Mobilité

Il a été observé une différence significative entre les valeurs moyennes d'HE4 chez patients présentant une asthénospermie (moins de 30% de mobilité progressive a+b à 1h) et ceux ne présentant pas d'asthénospermie ( $54.8 \pm 23.54$  pmol/l vs  $42.94 \pm 15.87$  pmol/l ;  $p=0.0441$ ).



**Figure 1 : Les valeurs d'HE4 sont plus élevées chez les patients ayant une asthénospermie**

De même, les patients ayant plus de 58% (seuil de vitalité) de spermatozoïdes immobiles ont des valeurs d'HE4 20% plus élevées que les autres patients (respectivement 51.36 +/- 21.15 pmol/l et 42.61 +/-15.69) mais cette différence n'est pas significative,  $p=0.0639$ .

### iii. Morphologie

Les 34 patients ayant une tératospermie (<4% de formes typiques selon la classification de Kruger) n'ont pas des valeurs d'HE4 différentes de celles des 62 patients sans tératospermie (respectivement 44.56 +/-19.61 pmol/l et 43.65 +/-15.27 pmol/l ;  $p=0.8028$ ) ; ni des « témoins » n'ayant aucune anomalie du spermogramme (44.12 +/-15.42 pmol/l ;  $p=0.9054$ ). Il n'existe pas non plus de différence significative entre les patients ayant moins de 2% et ceux ayant plus de 8% de formes typiques (respectivement 45.69 +/- 20.52 pmol/l et 39.77 +/-11.89 pmol/l ;  $p= 0.2517$ ).

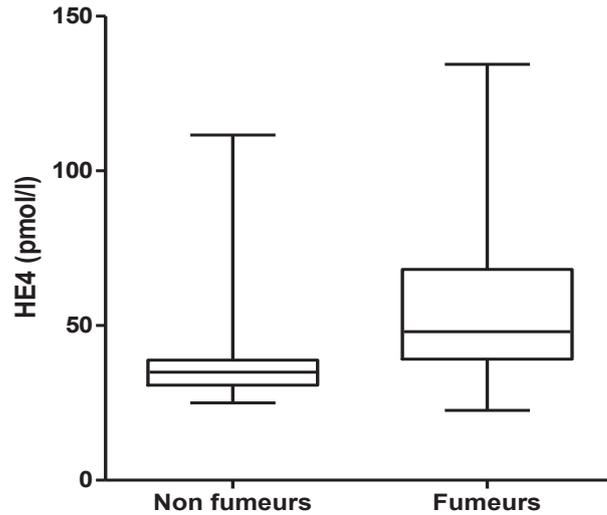
### b. Paramètres sériques : Gonadotrophines, inhibine B et testostérone

Nos résultats ne mettent en évidence aucune corrélation entre HE4 et FSH ( $R^2 = 0.0015$ ) ; ni entre HE4 et LH ( $R^2 = 0.0075$ ) ; ni entre HE4 et inhibine B ( $R^2 = 0.00006$ ) ; ni entre HE4 et testostérone ( $R^2 = 0.0049$ )

### c. Autres paramètres clinico-biologiques :

#### i. Tabagisme

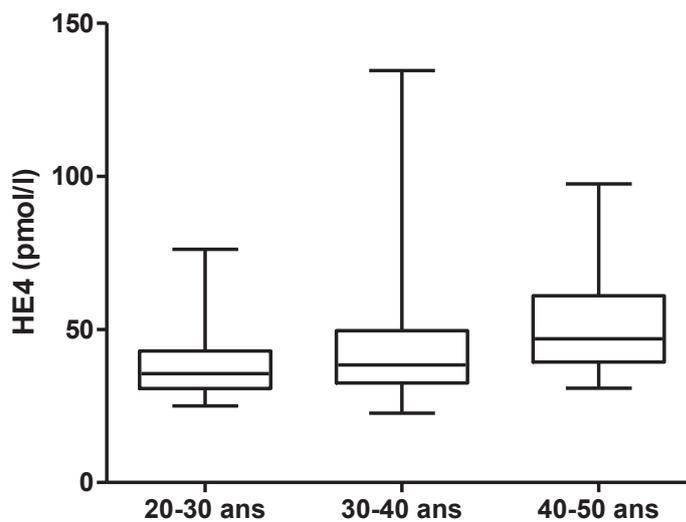
Parmi les 120 patients de notre cohorte, 52 étaient fumeurs, 47 déclaraient ne jamais fumer et 21 étaient en cours de sevrage tabagique. Les valeurs d'HE4 étaient significativement plus élevées chez les patients fumeurs que chez les non-fumeurs (54.9 +/-23 pmol/l vs 37.3+/-13 pmol/l ;  $p=0.0001$ ). (Figure 2)



**Figure 2 : Les valeurs d'HE4 sont plus élevées chez les patients fumeurs**

ii. Age des patients

Par ailleurs, nous avons pu constater une augmentation des taux d'HE4 avec l'âge. Dans notre cohorte, 29 patients avaient un âge compris entre 20 et 30 ans ; 71 étaient âgés de 31 à 40 ans et 20 avaient plus de 40 ans. Il n'a pas été observé de différence significative entre les deux premiers groupes ni entre les deux derniers. Par contre, les patients âgés de moins de 31 ans ont des taux significativement plus bas que les patients âgés de plus de 40 ans (40.0 +/- 13.8 pmol/l vs 51.4 +/- 17.4 pmol/l ; p=0.01).



**Figure 3 : Les valeurs d'HE4 sont plus élevées chez les patients les plus âgés**

### iii. La créatininémie

Nos résultats nous permettent d'observer une augmentation des valeurs d'HE4 chez les patients ayant une créatininémie plus élevée. En effet, si l'on prend comme valeur de référence la valeur moyenne d'HE4 chez les patients ayant une créatininémie strictement inférieure à 70  $\mu\text{mol/l}$ , on constate que les taux d'HE4 sont plus élevés de 14% chez les patients ayant une créatininémie comprise entre 70 et 90  $\mu\text{mol/l}$  ; et qu'ils sont plus élevés de 24% chez les patients ayant une créatininémie strictement supérieure à 90  $\mu\text{mol/l}$ .

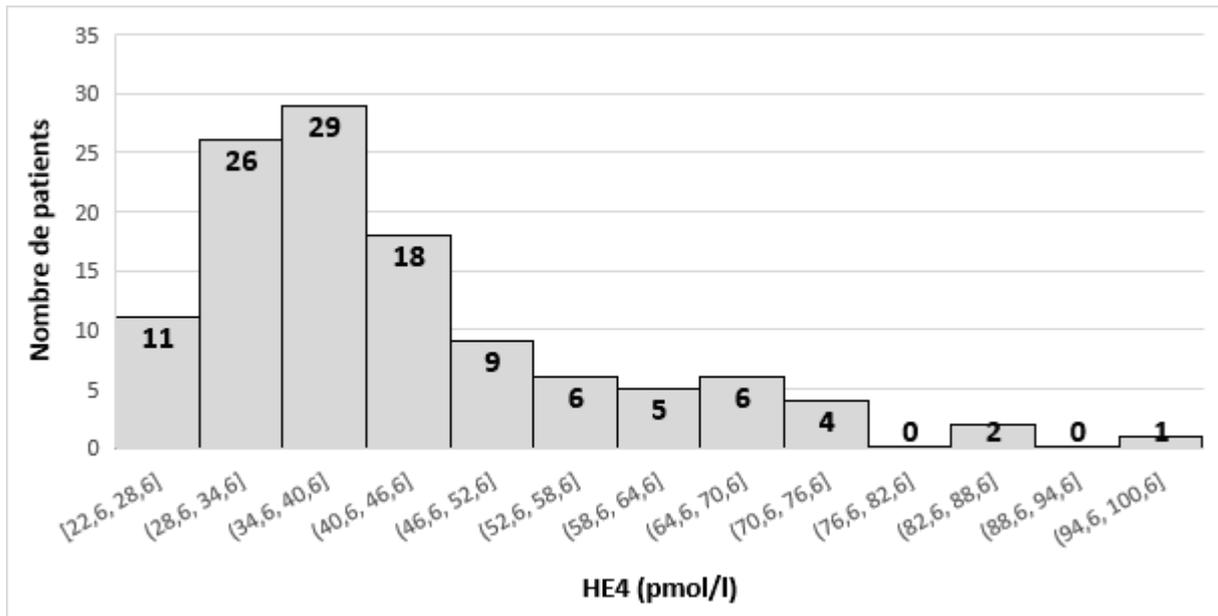
### iv. L'IMC

Parmi les 120 patients de notre cohorte, le calcul de l'IMC était possible pour 112 patients. La valeur moyenne de l'IMC était 25.0 +/-3.4  $\text{kg/m}^2$ . Il n'a pas été constaté de différence significative entre les 57 patients ayant un IMC normal, entre 18.5 et 25  $\text{kg/m}^2$ , et les 47 étant en surpoids avec un IMC compris entre 25 et 30  $\text{kg/m}^2$ , ni avec les 8 patients obèses, avec un IMC >30  $\text{kg/m}^2$ , respectivement 44.82 +/-21.22  $\text{pmol/l}$  ; 42.34 +/-12.82  $\text{pmol/l}$   $p=0.4843$  ; 48.18 +/-13.33  $\text{pmol/l}$   $p=0.6658$ . D'autre part, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les valeurs D'HE4 et l'IMC ( $R^2 = 0.014$ )

### d. Etablissement de valeurs de références

N'ayant pas constaté de différence significative entre notre cohorte de « cas » et celle de « témoins », nous avons pu établir des valeurs de références chez les hommes de 18 à 50 ans avec la trousse de dosage EIA de Fujirebio dans notre laboratoire grâce à l'aide de Madame Sylvie Dantard, Manager marketing chez Fujirebio, qui a utilisé le logiciel Analyze it : 7 à 93  $\text{pmol/l}$  (IC à 95%).

La courbe de distribution présentée ci-dessous n'inclut pas les résultats de 3 patients ayant des valeurs sériques d'HE4 supérieures à la moyenne (45.01  $\text{pmol/l}$ ) plus 3 écart-types (3x19.41  $\text{pmol/l}$ ). Après examen des 3 dossiers cliniques, nous n'avons pas retrouvé d'explication à ces valeurs augmentées.



*Figure 4 : Courbe de distribution des valeurs d'HE4 chez les patients âgés de 18 à 50 ans*

## Discussion

### 1. Exposition du résultat principal :

L'objectif principal de notre étude était de déterminer si les hommes ayant un spermogramme normal avaient un taux sérique d'HE4 différent de celui des patients ayant des altérations des paramètres spermatiques. Notre étude démontre que ce n'est pas le cas.

### 2. Validité externe : confrontation aux données de la littérature

#### a. Les cancers :

Grâce à la génomique, l'expression d'HE4 a pu être mise en évidence dans de nombreux tissus humains tels les cellules trachéales et celles des glandes salivaires ou, dans une moindre mesure, le poumon, la prostate, la thyroïde, l'hypophyse et le rein. Par ailleurs, certains tissus tumoraux peuvent aussi fortement exprimer HE4 : c'est le cas notamment des carcinomes papillaires séreux de l'ovaire, des adénocarcinomes pulmonaires et de manière plus modérée des cancers du pancréas (20). Nous avons donc choisi de ne pas inclure dans notre étude les patients ayant des antécédents de cancer.

#### b. La fonction rénale

En 2011, une étude multivariée menée sur 801 femmes et 790 hommes sains d'une population nordique révélait que l'augmentation du taux de HE4 était corrélée à l'augmentation de la créatininémie : elle constatait une augmentation de 27% de HE4 chez des patients avec une créatininémie à 100  $\mu\text{mol/l}$  par rapport à ceux avec une créatininémie à 50  $\mu\text{mol/l}$ . Ces résultats suggéraient une élimination rénale de ce marqueur (19). Nous avons donc vérifié l'absence d'insuffisance rénale chez l'ensemble de nos patients par un dosage de la créatininémie et nous nous sommes assuré que les valeurs de créatinine étaient équivalentes dans nos deux groupes afin d'éliminer un potentiel facteur confondant. Notre étude a elle aussi permis de constater une augmentation des valeurs d'HE4 associée à l'augmentation de la créatininémie.

c. L'âge :

Il a été démontré que le taux d'HE4 augmente progressivement avec l'âge : il est deux fois plus élevé à 80 ans par rapport à 20 ans (19). De nombreuses autres études ont également confirmé cette tendance (17,21), c'est pourquoi nous avons apparié nos deux groupes de patients sur l'âge. Dans notre étude nous retrouvons également des valeurs significativement plus élevées chez les patients les plus âgés. Néanmoins, l'augmentation notable de la valeur d'HE4 apparaît à partir de 80 ans (17) alors que nos patients sont âgés de moins de 50 ans. Les causes précises de cette augmentation avec l'âge restent incertaines et pourraient être multifactorielles : apparition de comorbidités, augmentation de la prévalence des cancers à un stade infra-clinique, altération de la fonction rénale,...

d. Le tabac

Dans notre étude, nous nous sommes assurés que la proportion de fumeurs était équivalente dans les deux groupes car il est connu que les fumeurs ont des taux d'HE4 20 à 30 % plus élevés que les non-fumeurs (17,19). Notre étude a également révélé des taux significativement plus élevés chez les patients fumeurs par rapport aux non-fumeurs.

e. L'IMC

Chez les patients nordiques, l'étude suggérait un impact de l'IMC sur les variations d'HE4, cependant les patients avec l'IMC le plus élevé étaient aussi plus âgés, il était donc difficile d'incriminer le poids (19). Il a effectivement été démontré plus tard qu'il n'existe pas de différences significatives des taux d'HE4 selon l'IMC (17,22). Dans notre étude non plus l'IMC n'est pas corrélé aux valeurs d'HE4.

3. Discussion des données non significatives ou divergentes

Chez la femme, on peut observer des variations des taux sériques d'HE4 au cours du cycle menstruel (23). Il a aussi été démontré des différences significatives selon le statut ménopausique. De faibles variations ont également été constatées au cours de la grossesse sans différence significative (21). Ces données suggèrent un éventuel impact des hormones stéroïdiennes ou des

gonadotrophines sur la sécrétion d'HE4. Cependant, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence dans notre étude entre les valeurs d'HE4 et celles de FSH, de LH, d'inhibine B ou de testostérone.

#### 4. Validité interne : exposition des biais et des limites de l'étude

Les valeurs de FSH, LH et inhibine B étant différentes dans nos deux groupes de patients, il aurait pu être intéressant de réaliser une analyse multivariée afin de s'assurer qu'aucun de ces paramètres ne soit un facteur confondant.

Par ailleurs, l'effectif de patients présentant une asthénospermie était assez faible et la proportion de fumeurs était un peu plus élevée chez ces derniers par rapports aux autres patients sans asthénospermie (54% vs 45%). Or la consommation de tabac est connue pour être associée à l'asthénospermie (24). Il serait donc intéressant d'augmenter nos effectifs et de doser HE4 chez des patients non-fumeurs présentant une asthénospermie.

#### 5. Indication des points forts des résultats : association HE4 et asthénospermie

A notre connaissance, pour la première fois des taux sériques d'HE4 élevés ont été associés à l'asthénospermie. En 2009, il avait été démontré qu'HE4 était augmentée dans le liquide séminal des patients ayant une asthénospermie par rapport aux donneurs de sperme sans anomalie des paramètres spermatiques (25).

L'établissement de la mobilité du spermatozoïde est la première condition nécessaire, mais non suffisante, pour qu'il puisse féconder. L'épididyme est connu pour être une zone de maturation des spermatozoïdes où ils acquièrent à la fois leur mobilité et leur pouvoir fécondant. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles augmente régulièrement de la tête où ils sont peu nombreux et présentent un mouvement pour l'essentiel non progressif jusqu'à la partie distale du corps de l'épididyme où la majorité des spermatozoïdes sont animés d'un mouvement progressif. Ces deux paramètres décroissent dans la partie terminale de l'épididyme, la queue, où les spermatozoïdes sont stockés entre deux éjaculations (26). La partie distale du corps épидидymaire et la queue de l'épididyme sont les zones du tractus génital masculin où HE4 est majoritairement retrouvée, bien qu'elle soit également présente dans le canal déférent et les vésicules séminales (9).

Après avoir quitté le testicule, les spermatozoïdes ne sont plus capables ni de transcrire ni de traduire de nouvelles protéines, leur maturation post-testiculaire se fait donc par interaction avec le milieu environnant. Ce sont les modifications de la membrane qui influent à la fois sur l'aptitude à la motilité menant à l'hyperactivité du spermatozoïde et sur l'acquisition de leur pouvoir fécondant (27,28). C'est ce qui définit le phénomène de capacitation.

HE4 possède une certaine homologie structurale avec des protéines étant la cible de protéases de la capacitation. On sait qu'elle exerce un effet inhibiteur sur certaines protéases. Par ailleurs, HE4 est présente sur toute la surface du spermatozoïde éjaculé mais elle est perdue suite à la capacitation *in vitro*, tel qu'un test de migration-survie (TMS). Ces données prédisent un rôle certain d'HE4 dans la maturation des gamètes masculines en tant que facteur décapacitant (9,10,28). Notre protéine d'intérêt pourrait jouer un rôle de défense contre les protéases lors de la migration et pendant le stockage des spermatozoïdes au sein des voies génitales masculines.

#### 6. Conclusion et perspectives de travail :

Pour poursuivre ce travail et affiner nos résultats, il pourrait être intéressant de mettre en relation les valeurs sériques d'HE4 avec la mobilité spermatique obtenue après un test de migration-survie afin de déterminer si ce marqueur pourrait être prédictif du rendement du TMS. D'autre part, l'autre versant de la maturation épидидymaire étant l'acquisition du pouvoir fécondant, il serait intéressant de confronter les valeurs sériques d'HE4 au pourcentage d'ovocytes effectivement fécondés lors d'une FIV.

En conclusion, notre étude ne nous a pas permis de mettre en évidence un nouvel outil diagnostique dans l'exploration de l'infertilité masculine. Cependant, une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maturation du spermatozoïde humain permettrait d'identifier des protéines cibles afin de développer des thérapeutiques luttant contre l'infertilité ou, au contraire, trouver des méthodes de contraception masculine.

## Bibliographie

1. Slama R, Hansen O, Bohet A, Ducot B, Eijkemans M, Rosetta L, et al. L'Observatoire épidémiologique de la Fertilité en France : Un Outil de Description de la Fertilité de la Population Générale et de sa Sensibilité aux Facteurs Environnementaux. :15.
2. Slama R, Hansen OKH, Ducot B, Bohet A, Sorensen D, Giorgis Allemand L, et al. Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis. *Hum Reprod.* 1 mai 2012;27(5):1489-98.
3. Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod.* 1 mai 2005;20(5):1144-7.
4. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod Oxf Engl.* juill 1991;6(6):811-6.
5. Blondel B, Supernant K. Enquête nationale périnatale 2003 - Situation en 2003 et évolution depuis 1998. 2003;112.
6. Schlosser J, Nakib I, Carré-Pigeon F, Staerman F. Infertilité masculine: définition et physiopathologie. *Ann Urol.* juin 2007;41(3):127-33.
7. Auger J, Jouannet P. Decline in Semen Quality among Fertile Men in Paris during the Past 20 Years. *N Engl J Med.* 1995;332(5):5.
8. Splingart C, Frapsauce C, Veau S, Barthélémy C, Royère D, Guérif F. Semen variation in a population of fertile donors: evaluation in a French centre over a 34-year period. *Int J Androl.* 1 juin 2012;35(3):467-74.
9. Kirchhoff C, Osterhoff C, Pera I, Schröter S. Function of human epididymal proteins in sperm maturation. *Andrologia.* 24 avr 2009;30(4-5):225-32.
10. Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. :10.
11. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, Krull N. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod.* août 1991;45(2):350-7.
12. Clauss A, Lilja H, Lundwall Å. A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein. *Biochem J.* 15 nov 2002;368(1):233-42.
13. Lundwall Å. A locus on chromosome 20 encompassing genes that are highly expressed in the epididymis. *Asian J Androl.* juill 2007;9(4):540-4.
14. Chhikara N, Saraswat M, Tomar AK, Dey S, Singh S, Yadav S. Human Epididymis Protein-4 (HE-4): A Novel Cross-Class Protease Inhibitor. Abrams WR, éditeur. *PLoS ONE.* 5 nov 2012;7(11):e47672.

15. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, et al. Human Epididymis Protein 4 (HE4) Is a Secreted Glycoprotein that Is Overexpressed by Serous and Endometrioid Ovarian Carcinomas. *Cancer Res.* 15 mars 2005;65(6):2162-9.
16. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, DiSilvestro P, Miller MC, Allard WJ, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* janv 2009;112(1):40-6.
17. Ferraro S, Schiumarini D, Panteghini M. Human epididymis protein 4: Factors of variation. *Clin Chim Acta.* janv 2015;438:171-7.
18. Pilatz A, Bürger M, Lüdecke G, Wagenlehner F, Weidner W. Clinical evaluation of human epididymis protein 4 as a biomarker for epididymitis. *Biomark Med.* juin 2012;6(3):311-7.
19. Bolstad N, Øijordsbakken M, Nustad K, Bjerner J. Human epididymis protein 4 reference limits and natural variation in a Nordic reference population. *Tumor Biol.* févr 2012;33(1):141-8.
20. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol.* juin 2006;19(6):847-53.
21. Moore RG, Miller MC, Eklund EE, Lu KH, Bast RC, Lambert-Messerlian G. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. *Am J Obstet Gynecol.* avr 2012;206(4):349.e1-349.e7.
22. Ferraro S, Borille S, Caruso S, Boggio A, Muzio F, Rizzi A, et al. Body mass index does not influence human epididymis protein 4 concentrations in serum. *Clin Chim Acta.* juin 2015;446:163-4.
23. Anastasi E, Granato T, Marchei GG, Viggiani V, Colaprisca B, Comploj S, et al. Ovarian tumor marker HE4 is differently expressed during the phases of the menstrual cycle in healthy young women. *Tumor Biol.* 1 oct 2010;31(5):411-5.
24. Sepaniak S, Forges T, Fontaine B, Gerard H, Foliguet B, Guillet-May F, et al. Impact négatif du tabac sur la fertilité masculine : des spermatozoïdes à la descendance. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod.* sept 2004;33(5):384-90.
25. Wang J, Wang J, Zhang H-R, Shi H-J, Ma D, Zhao H-X, et al. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian J Androl.* juill 2009;11(4):484-91.
26. Yeung CH, Cooper TG, Oberpenning F, Schulze H, Nieschlag E. Changes in Movement Characteristics of Human Spermatozoa along the Length of the Epididymis1. *Biol Reprod.* 1 août 1993;49(2):274-80.
27. Kuo Y-W, Li S-H, Maeda K-I, Gadella BM, Tsai PSJ. Roles of the reproductive tract in modifications of the sperm membrane surface. *J Reprod Dev.* 2016;62(4):337-43.
28. Sullivan R, Mieusset R. The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update.* sept 2016;22(5):574-87.

# Annexes

## Annexe 1 : Avis favorable du comité de protection des personnes Sud Méditerranée pour la constitution de la sérothèque « peptides gonadiques »



PRÉSIDENT : PHILIPPE BABE  
VICE-PRÉSIDENTE : PATRICK CHICHE  
SECRETAIRES GÉNÉRAUX : JOCELYN GAL  
TRÉSORIER : PIERRE TOULON

ASSISTANTE MÉDICO-ADMINISTRATIVE -  
INGÉNIEURE QUALITÉ : SAËBE-FRANÇOISE DESCHAMPS

NICE, le 08/09/2016

<b>NOM DE LA COLLECTION</b>		PEPTIDES GONADIQUES	
<b>Organisme assurant la constitution de la collection</b>		CHU de Nice	
<b>Personne responsable de la collection au sein de cet organisme</b>		Docteur PANAIÀ - FERRARI	
<b>N° ENREGISTREMENT</b>		DC 2016-2786	
<b>Réf CPP</b>		16.053	REFERENCE PROMOTEUR /
<b>RECEVABILITE DATEE DU</b>		23/08/2016	
<b>Nature des échantillons</b>		Sang périphérique (fond de tube) Sang de cordon	
<b>DOCUMENTS D'INFORMATION</b>		<b>VERSION N°</b>	<b>Non numérotée</b>
		<b>Datée du</b>	<b>Non datée</b>
<b>AUTORISATION DE LIEU :</b>		NA	
<b>Le Comité a examiné les informations relatives à ce protocole référencé localement et nationalement ci-dessus relatif à</b>		UNE COLLECTION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES	
<b>Date de séance</b>		06/09/2016	<b>Présidée par</b>
			PH BABE
<b>Au titre d'une demande d'avis concernant</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>Projet initial</b>	<b>Dans le cadre de :</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>Première soumission</b>
			<input type="checkbox"/> <b>Nouvelle soumission d'un projet modifié en réponse aux observations du CPP du déposée le</b>

### Étaient présents à la réunion :

#### Titulaires

Philippe BABE, Médecin, Spécialiste en Pédiatrie, 1er collège,  
Ronny BENSALD, Médecin, 1er collège,  
Patrick CHICHE, Juriste, 2ème collège,  
Jocelyn GAL, Méthodologiste, 1er collège,  
Pierre-Yves GROSSE, Pharmacien, 1er collège,  
Bruno MALAFRONTÉ, Psychologue, 2ème collège,  
Martine PELSEZ, Représentante des Associations et des Usagers du Système de Santé, 2ème collège,  
Jean SAÏDE, Représentant des Associations et des Usagers du Système de Santé, 2ème collège,  
Flavia SPIRITO, Qualifiée en matière d'éthique, 2ème collège,  
Pierre TOULON, Médecin, 1er collège,

#### Suppléants

Elodie BIANCHI-PILLET, Avocate, 2ème collège  
Carine GHIONDA, Pharmacien, 1er collège,  
Maggy PINCEMIN, Représentante des Associations et des Usagers du Système de Santé, 2ème collège,  
Karim TIFRATENE, Méthodologiste, 1er collège,

Ont participé à la délibération :

**Titulaires**

Philippe BABE, Médecin, Spécialiste en Pédiatrie, 1er collège,  
Ronny BENSALD, Médecin, 1er collège,  
Patrick CHICHE, Juriste, 2ème collège,  
Jocelyn GAL, Méthodologiste, 1er collège,  
Pierre-Yves GROSSE, Pharmacien, 1er collège,  
Bruno MALAFRONTÉ, Psychologue, 2ème collège,  
Martine PELSEZ, Représentante des Associations et des Usagers du Système de Santé, 2ème collège,  
Jean SAIDE, Représentant des Associations et des Usagers du Système de Santé, 2ème collège,  
Flavia SPIRITO, Qualifiée en matière d'éthique, 2ème collège,  
Pierre TOULON, Médecin, 1er collège,

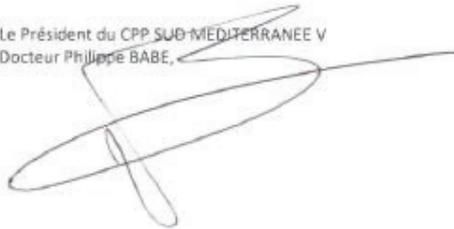
**Suppléants**

Elodie BIANCHI-PILLET, Avocate, 2ème collège

Le Comité a adopté la délibération suivante :

**AVIS FAVORABLE**

Le Président du CPP SUD-MEDITERRANEE V  
Docteur Philippe BABE,



## Centre Hospitalier Universitaire de Nice

Laboratoire de Biochimie, Uf d'Endocrinologie

Responsable projet : Dr P. Panaïa-Ferrari / chef service : Pr G. Chinetti

Téléphone : 04 92 03 76 04

### **Note d'information à l'intention des patients pour, la conservation et l'utilisation d'échantillons biologiques humains ainsi que l'utilisation des données à des fins de recherche**

Monsieur,

**Lors d'un séjour hospitalier, il arrive souvent que des échantillons biologiques comme sang, urine, salive,... soient prélevés et examinés.** La plupart du temps, ces échantillons ne sont pas utilisés dans leur totalité à des fins de diagnostic et de traitement. Mais, combinés avec certaines données vous concernant (ex : âge, sexe, état de santé...) ils représentent des informations précieuses pour la recherche. L'objectif de la recherche est de favoriser le développement des connaissances en santé. Elle n'a pas vocation à modifier ou adapter votre prise en charge.

**Les échantillons ainsi recueillis (sang veineux) pourraient être utilisés dans le cadre d'un programme de recherche** sur les l'étude des marqueurs biologiques des pathologies des organes reproducteurs et conservés jusqu'à la fin de ce programme dans le Laboratoire d'Endocrinologie du CHU de Nice dirigé par le Dr Patricia Panaïa-Ferrari (04 92 03 76 04). Passé ce délai, les échantillons seront détruits selon les dispositions réglementaires (articles R. 1335-1 à R.1335-14 du Code de Santé Publique).

#### ***La réalisation du programme de recherches***

Les travaux de recherche pourront être conduits par les équipes du CHU de Nice seules, ou en collaboration avec des équipes d'autres structures de recherche publique (INSERM / CRNS...). Des collaborations peuvent être réalisées avec des équipes privées, industrielles, françaises ou étrangères. Des recherches pourront également être conduites par ces organismes en dehors de toute collaboration avec le CHU de Nice. Pour cela, le CHU de Nice pourra transférer gratuitement vos échantillons et les données médicales associées.

#### ***Confidentialité des données***

Dans le cadre du programme de recherche, il est nécessaire de disposer de **données vous concernant**. Celles-ci sont conservées dans votre dossier médical et **gérées informatiquement en respectant des conditions de confidentialité**.

En cas de traitement automatisé des données à caractère personnel ayant pour fin la recherche dans le domaine de la santé ont été, il devra être autorisé par la CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés) selon la Loi 95-548 du 1 juillet 1994 et décret n° 95-682 du 09 mai 1995 complétée par la loi relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel du 6 août 2004, articles L53 à L61.

**L'accès à vos données est strictement réglementé et se fera sous la responsabilité d'un médecin** uniquement par des personnes habilitées, soumises au **secret professionnel** et collaborant au programme de recherche. Vous pouvez vous opposer à l'utilisation de vos données à des fins de recherche en exprimant votre refus. Vous possédez un droit d'accès et de rectification, à tout moment,

à vos données soit directement soit indirectement par l'intermédiaire du médecin de votre choix. De plus, elles ne peuvent être transmises à d'autres biobanques que si celles-ci observent les mêmes standards de confidentialité que le CHU de Nice.

Au terme du délai prévu par l'article R. 2045 de la Loi Informatique et Libertés, vous pourrez vérifier la destruction de ces données par l'intermédiaire du Laboratoire d'Endocrinologie du CHU de Nice dirigé par le Dr P. Panaïa-Ferrari ou des autorités de santé.

### ***Risques***

Les risques engendrés par le prélèvement effectué dans le cadre de ce programme de recherche sont **négligeables** car **aucun prélèvement supplémentaire n'est nécessaire**.

### ***Modalités administratives***

#### **1. Déclaration au Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée V**

L'organisme assurant la constitution de la collection, le CHU de Nice, a soumis cette constitution de collection d'échantillons biologiques à l'avis consultatif du Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée V conformément à la loi 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique et a obtenu un avis favorable le 08/09/2016.

En cas de changement de finalité du programme de recherche pour lequel vous avez donné votre accord, un nouvel avis du CPP SUD MEDITERRANEE V devra être sollicité et un nouveau consentement pourra vous être demandé.

#### **2. Déclaration au Ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche (MESR)**

L'organisme assurant la constitution de la collection, le CHU de Nice, a déclaré cette constitution de collection d'échantillons biologiques au Ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche (MESR) sous le numéro DC 2016-2786

### ***Divers***

#### **1. Le donneur ne peut prétendre à aucun bénéfice commercial**

Les résultats de ce programme de recherche peuvent, le cas échéant, contribuer au développement de produits commerciaux (par exemple de nouveaux médicaments). Par votre consentement, vous renoncez à toute prétention à des bénéfices commerciaux ou brevets en relation avec vos échantillons et données.

#### **2. Indemnisation**

Votre participation à ce programme de recherche ne pourra donner lieu à aucune indemnité.

#### **3. Droit de révocation**

Vous pouvez à tout moment révoquer votre non-opposition. Une fois que vous vous y serez opposé, vos échantillons et vos données ne pourront plus être utilisés et seront détruits.

Vous pouvez adresser votre révocation au Dr Patricia Panaïa-Ferrari, laboratoire d'Endocrinologie, Pavillon J3 Hôpital Pasteur, 30 avenue de la Voie Romaine 06001 Nice cedex 1.

***Vous souhaitez en savoir davantage ?***

Si vous souhaitez obtenir des informations complémentaires, vous pouvez vous adresser au médecin responsable qui pourra vous renseigner de manière détaillée : Dr Patricia Panaïa-Ferrari au 04 92 03 76 04 ou par mail : [panaia-ferrari.p@chu-nice.fr](mailto:panaia-ferrari.p@chu-nice.fr)

***Votre participation est libre***

Avant de vous décider, nous récapitulons les **informations essentielles** :

- **Vous et vous seul pouvez décider de mettre vos données et échantillons à disposition de la recherche**, ceci tout à fait librement, sans pression et après avoir obtenu les informations nécessaires.
- Le fait de donner votre accord ne donnera lieu à aucun avantage ni inconvénient pour vous. **Votre prise en charge diagnostique et thérapeutique ne sera en aucun cas modifiée.**
- **Aucun prélèvement supplémentaire ne sera nécessaire.**

**Nous avons besoin de votre aide pour participer à ce programme de recherche.**

Si vous souhaitez y participer, nous vous demandons de bien vouloir lire, cocher, dater, et signer la non-opposition ci-dessous. Vous pouvez également vous opposer à l'utilisation de vos échantillons et données à des fins de recherche en exprimant votre refus sur ce même document.

**Merci de bien vouloir nous renvoyer l'un des 2 exemplaires de ce document, complété par vos soins, grâce à l'enveloppe timbrée fournie. Vous conserverez le deuxième exemplaire.**

Vous avez la possibilité de demander un délai de réflexion et de poser toutes les questions relatives à cette démarche avant de prendre votre décision.

**Quelle que soit votre décision, nous tenons à vous remercier de l'attention que vous avez portée à la lecture de ce document.**

Nom.....Prénom .....
Adresse..... .....
Atteste :
<input type="checkbox"/> <b>Ne pas m'opposer</b> à l'utilisation de mes échantillons et des données anonymisées associées dans le cadre du programme de recherche sur les marqueurs biologiques des pathologies des organes reproducteurs.
<input type="checkbox"/> <b>M'opposer</b> à l'utilisation de mes échantillons et des données anonymisées associées dans le cadre du programme de recherche sur les marqueurs biologiques des pathologies des organes reproducteurs. Des réponses ont été apportées à toutes mes questions. J'ai disposé d'un délai de réflexion avant de prendre ma décision.
Fait à Nice, le 07/06/18 Signature du médecin Dr Patricia Panaïa-Ferrari
Fait à ..... , le ..... Signature du patient

Fait en deux exemplaires dont un conservé par le patient.

## Annexe 3 : Mode opératoire du dosage manuel d'HE4 distribuée par Fujirebio Diagnostics, Göteborg, Suède

### PROCÉDURE DE DOSAGE

Réaliser chaque test en double pour les étalons, les contrôles et les échantillons inconnus. Une courbe d'étalonnage doit être réalisée pour chaque dosage. Tous les réactifs et échantillons doivent se trouver à température ambiante (20 à 25 °C) avant usage.

- Commencer à préparer les étalons B à F, les contrôles 1 et 2, la solution de lavage et la solution de travail du traceur. La propreté des conteneurs est essentielle. Respecter scrupuleusement les instructions.
- Transférer le nombre requis de barrettes de microplaques sur un cadre. (ranger immédiatement les barrettes restantes dans le sachet en aluminium avec le dessiccateur et refermer hermétiquement avec soin). Laver chaque barrette une fois avec la solution de lavage. Ne pas laver plus de barrettes que la quantité pouvant être traitée en 30 min.
- Pipeter 25 µL de chaque étalon HE4 (CAL A, B, C, D, E et F), de contrôles HE4 (C1, C2) et d'échantillons inconnus (Inc) dans les puits, selon le schéma suivant :

	1	2	3	4	5	6	7 etc.
A	Cal A	Cal E	1 <sup>er</sup> Inc				
B	Cal A	Cal E	1 <sup>er</sup> Inc				
C	Cal B	Cal F	2 <sup>e</sup> Inc				
D	Cal B	Cal F	2 <sup>e</sup> Inc				
E	Cal C	C1					
F	Cal C	C1					
G	Cal D	C2					
H	Cal D	C2					

- Ajouter 100 µL de biotine anti-HE4 dans chaque puits à l'aide d'une pipette de précision de 100 µL (ou une pipette de précision de 100 µL à 8 canaux). Ne pas faire toucher l'embout de la pipette à la surface du liquide pour éviter toute contamination par transfert.
- Laisser incuber la plaque pendant 1 heure (± 10 min) à température ambiante (20-25 °C), en l'agitant constamment dans un agitateur de microplaques.
- Après la première incubation, aspirer et laver chaque barrette 3 fois selon la procédure de lavage décrite dans Remarques sur la procédure, paragraphe 4.
- Ajouter 100 µL de solution de travail du traceur dans chaque puits. Procéder selon le pipetage décrit à l'étape 4 ci-dessus.
- Incuber le cadre pendant 1 heure (± 5 min) à température ambiante (20–25 °C) en l'agitant constamment.
- Après la deuxième incubation, aspirer et laver chaque barrette 6 fois selon la procédure de lavage décrite dans Remarques sur la procédure, paragraphe 4.
- Ajouter 100 µL de substrat TMB HRP dans chaque puits selon la technique de pipetage décrite à l'étape 4 ci-dessus.  
Le substrat TMB HRP doit être ajouté dans les puits aussitôt que possible et le délai entre l'ajout au premier et au dernier puits ne doit pas dépasser 5 min.
- Laisser incuber pendant 30 min (± 5 min) à température ambiante (20–25 °C) en agitant constamment. Éviter l'exposition à la lumière directe du soleil.
- Lire immédiatement l'absorbance à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques.

#### Option

Si le laboratoire ne dispose pas d'un lecteur de microplaques équipé d'un filtre à 620 nm, l'absorbance peut être déterminée en remplaçant l'étape 12 ci-dessus par la suivante :

- Alt. 12. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt, mélanger et lire l'absorbance à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques dans les 15 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt.

## **Annexe 4 : Instruction for authors, Human Reproduction**

### **1. Title Page**

Title: Should not exceed 25 words and should be specific and informative. Trade marks and proprietary terms are not allowed in the title. The words ‘randomised controlled trial’ should be in the title (as set out in the CONSORT guidelines).

Running title: Should not exceed 50 characters.

Authors: Give initials and family name of all authors.

NB - A declaration of Author’s roles is required at submission and this information MUST be included in the manuscript (after Acknowledgements, before the Funding statement).

Author affiliations and addresses: The department, institution, city and country should be given with postal code for each author. An e mail address will be published for the corresponding author, who should be clearly identified with an asterisk. Current addresses should be provided for all authors.

### **2. Abstract**

All original research articles published in Human Reproduction are now required to have an extended abstract. The aim behind the change to this new format is to capture the essence, novelty and importance of each study, making the information more instantly available to readers. The abstract should clearly set out the research question, study design, findings, implications, funding and competing interests. Details of trial registration (including trial registration number, date of trial registration and date of enrolment of first patient) must also be stated.

### **3. Key words**

Up to ten key words must be supplied by the author. The key words, together with the title and abstract, are used for online searches. They should therefore be specific and relevant to the paper.

### **4. Introduction**

The introduction should be limited to the specific background necessary to show the importance and context of the current study. The objective of the study should be clearly stated in the final paragraph of the Introduction.

### **5. Materials and methods**

The names and country of origin of all suppliers should be included.

Randomized controlled trials should be reported in accordance with the newly-revised CONSORT 2010 (Consolidated Standards of Reporting Trials) statement: [Schulz KF,

Altman DG, Moher D, for the CONSORT Group. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. BMJ 2010;340:c332].

Authors must provide the following: (i) [flow chart](#) showing the progress of participants through the trial; (ii) A [checklist](#) for editors and reviewers (not for publication) showing that you have described 25 key points in your report. CONSORT 2010 checklists and flow charts are available to download via the EQUATOR network.

All RCTs are reviewed by a team of journal appointed statisticians. A separate paragraph in the materials and methods should describe the trial statistics, specifically including sample size calculations and all analyses.

## **6. Results**

Unnecessary overlap between tables, figures and text should be avoided.

## **7. Discussion**

The discussion should begin with a succinct statement of the principal findings, outline the strengths and weaknesses of the study, discuss the findings in relation to other studies, provide possible explanations and indicate questions which remain to be answered in future research.

## **8. Acknowledgements**

Personal acknowledgements should precede those of institutions or agencies.

## **9. Author's roles**

Manuscripts must include details for the contributions of each of the authors, including participation in study design, execution, analysis, manuscript drafting and critical discussion (refer to 'Authorship' section).

## **10. Funding**

With respect to funding of research, in line with the World Association of Medical Editors (WAME) guidelines, <http://www.wame.org/wamestmt.htm> the journal considers it the responsibility of the author to protect the integrity of the research record from bias related to the source of funding by fully declaring all sponsorships, the roles played by sponsors in the research as well as institutional affiliations and relevant financial ties. These should be listed in the manuscript in the Funding section. Grant numbers should be given.

## **11. Conflict of interest**

Authors should include a conflict of interest statement on the manuscript detailing any potential conflicts of interest of any of the authors due to relationships with commercial/corporate interests – or that they have none to declare.

## **12. Reference citations within the text**

Authors are responsible for the accuracy of the references. Each reference should be cited by author and date. If there are two authors please list both, if more than two please use first author then et al. Permission to cite personal communications (J.Smith, personal communication) should be obtained by the corresponding author. Unpublished data should be cited as (unpublished data) and should not be included in the reference list. Either of the above should be used only when essential.

References to papers accepted for publication, but not yet published, should be cited as such in the reference list e.g. Bloggs A (2007) In vitro fertilization. Hum Reprod. In press.

### **13. Reference list**

References should be listed alphabetically. Please use the following style. Note that correct punctuation and journal abbreviations must be used in order to run the search programs used to edit the manuscript. Incorrectly typed references take a lot of time to correct, for which we reserve the right to charge. Up to 10 authors should be included after which et al. should be used.

### **14. Tables**

Tables should be uploaded as a separate document in an editable format.

Each table should be numbered consecutively with Roman numerals. Please avoid complex constructions. Each item of data should be in a separate cell and should be produced using Word or Excel format. Each table should be self explanatory and include a brief descriptive title. Footnotes to the table indicated by superscript lowercase letters are acceptable but should not include extensive experimental detail. Reference to the tables in the text should be sequential (ie Table I, II etc).

Do not include more tables than is absolutely necessary - non-essential tables may be judged as being suitable for online-only publication.

### **15. Figure legends**

Each legend must be self contained, with all symbols and abbreviations used in the figure defined.

### **16. Figures**

For RCTs the first figure should be the flowchart of patients through the study (CONSORT flowchart).

Figures should be uploaded as a separate file (or files) as .jpg or .tif files.

Figure 1 should be essentially the consort flowchart detailing the recruitment and assignment of participants.

Full instructions on preparing the figures are available as part of the online submission instructions. Please follow these instructions carefully as failure to do so will delay publication of your manuscript (please note: the editors reserve the right to charge for extensive changes).

In preparing graphs authors should avoid background tints and 3D effects and maintain a consistent label size and aspect ratio (the x/y axis ratio) throughout a paper. Figure and axes titles should be clear and NOT in bold text. Do not include more figures than is absolutely necessary - non-essential figures may be judged as being suitable for online-only publication.

## Serment d'Hippocrate

En présence des Maitres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qu'il s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'Humanité.

Respectueuse et reconnaissante envers mes Maitres, je donnerai à leur enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

