



HAL
open science

Mise en place du dosage de la phospholipase c zêta comme biomarqueur de compétence spermatique

Lucie Caline

► **To cite this version:**

Lucie Caline. Mise en place du dosage de la phospholipase c zêta comme biomarqueur de compétence spermatique. Médecine humaine et pathologie. 2024. dumas-04750491

HAL Id: dumas-04750491

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04750491v1>

Submitted on 23 Oct 2024

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



**THÈSE D'EXERCICE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN MÉDECINE**

**Spécialisation Biologie médicale
*Biologie de la reproduction***

Présentée à la faculté de médecine d'Amiens par **Lucie Caline**

Thèse n° 2024 – 122

**MISE EN PLACE DU DOSAGE DE LA PHOSPHOLIPASE C
ZETA COMME BIOMARQUEUR DE COMPÉTENCE
SPERMATIQUE**

Soutenue le 4 octobre 2024, devant le jury d'examen :

Présidente du Jury : M^{me} le Professeur Rosalie CABRY-GOUBET
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Membres du jury : M^{me} le Professeur Anne TOTET
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

M. le Professeur Saïd KAMEL
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

M^{me} le Docteur Gwladys BOURDENET
Praticien Hospitalier

Directeur de thèse : M. le Professeur Moncef BENKHALIFA
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

REMERCIEMENTS

Madame le Professeur Rosalie CABRY-GOUBET

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Histologie et Embryologie

Chef du service de Médecine et Biologie de la Reproduction et CECOS de Picardie

CHU Amiens Picardie, Centre de Biologie Humaine

Madame le Professeur,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse et vous suis très reconnaissante de l'intérêt que vous m'avez toujours porté au sein de votre service.

Je suis très admirative des qualités dont vous faites preuve dans la gestion du service de Médecine et Biologie de la Reproduction.

Je vous remercie pour la gentillesse, la confiance et la disponibilité que vous avez toujours eu à mon égard et vous en suis profondément reconnaissante.

Cher Professeur, veuillez trouver ici l'assurance de mon estime et de mon profond respect.

Madame le Professeur Anne TOTET

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

(Parasitologie et Mycologie)

Chef de service du laboratoire de Parasitologie et Mycologie médicales

Pôle Biologie et Pharmacie

Madame le Professeur,

Votre présence au sein de mon jury représente pour moi un grand honneur.

Je vous remercie pour vos conseils, vos encouragements, votre disponibilité et votre gentillesse tout au long de mon parcours en Biologie Médicale.

Veuillez trouver ici, Professeur, l'expression de mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Saïd KAMEL

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Monsieur le Professeur,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de thèse.

Je vous remercie de votre gentillesse et de votre disponibilité lors de mon internat de Biologie Médicale.

Veillez trouver ici, Professeur, l'expression de mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Gwladys BOURDENET

Praticien Hospitalier

Madame le Docteur Bourdenet,

Je suis honorée de vous compter parmi les membres de mon jury.

Je suis très reconnaissante du temps que vous m'avez accordé et de la disponibilité et de la gentillesse dont vous avez fait preuve envers moi durant ce travail.

Soyez assurée de mon sincère respect et de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Moncef BENKHALIFA

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Médecine et Biologie de la Reproduction et du Développement

Monsieur le Professeur,

Merci d'avoir accepté d'être mon Directeur de thèse.

Vous m'avez toujours accordé votre confiance et je vous en suis profondément reconnaissante.

Je vous remercie de l'intérêt que vous avez toujours porté à ma formation au sein du service.

Soyez assuré de mon sincère respect.

A ma famille,

Maman, Papa, merci pour votre soutien et votre aide quotidienne dans tout ce que j'entreprends depuis mes premières années de vie. Merci de m'avoir permis de me réaliser tant sur le plan personnel que professionnel. Je ne saurais jamais assez vous remercier de tout ce que vous avez toujours fait pour moi et le restant de ma vie j'aspirerai toujours à vous rendre fiers. Je suis si reconnaissante de l'éducation et des valeurs que vous m'avez transmises et j'espère à mon tour être un aussi bon parent que ce que vous êtes pour moi.

Paul, Olivier et Alice, merci d'enrichir ma vie au quotidien. Grandir avec et auprès de vous est quelque chose que je chéris chaque jour. Paul, mon binôme bien avant l'heure, je suis si heureuse de la relation que nous avons construit au fil des années et je suis fière de t'avoir comme frère jumeau. J'ai hâte de te voir prendre ce nouveau rôle qui t'attend et que tu rempliras à merveille. Olivier, même si la distance ne nous permet pas de nous voir fréquemment, je suis heureuse de te retrouver chaque fois que j'en ai l'occasion. Je suis ravie de te voir t'épanouir dans ton nouveau job qui te correspond entièrement. Alice, je me souviendrai toujours de ma joie lorsque j'ai appris que j'allais avoir une petite sœur. Je suis si heureuse de la relation de complicité que nous avons. Merci d'être la super tata de Loulou.

Mamie, Papi, Bon Papa et Bonne Maman, merci de m'avoir donné cette chance de vivre auprès de vous des moments de joie et d'échange si importants dans mon existence. Merci pour votre soutien indéfectible tout au long de mes études, je porterai avec moi vos encouragements pour cette journée si importante. Je vous remercie pour tout le savoir et les valeurs que vous m'avez transmises et vous en suis profondément reconnaissante.

A mes co-internes,

Alice, Ludivine, Benoite, Orianne, Justine, mes copinettes co-internes de Bio, je suis si heureuse de vous avoir dans ma vie. Merci pour ce que vous êtes, j'apprends beaucoup auprès de vous et j'ai hâte de voir ce que l'avenir nous réserve à chacune. Merci pour votre soutien et votre amitié si précieuse. Je compte bien ne jamais vous lâcher ☺

Yasmine, Manon et Adeline, mes co-internes des débuts en Pédiatrie, je suis ravie que mes débuts d'internat vous ai mises sur ma route. Je suis heureuse de vous compter parmi mes amies et j'adore les moments passés avec vous.

Manon, Sarah, Léa V, Océane, Alizée, Léa.S, Camille, Léa.B, Bérénice, Benjamin, Mathilde, Julie, Anais, mes co-internes de MBDR, je suis heureuse d'avoir travaillé avec vous, toujours en alliant bonne humeur et efficacité. Merci pour ces échanges riches qui lient nos deux disciplines et merci pour ces semestres réalisés ensemble.

A l'ensemble de mes co-internes, merci pour les semestres que nous avons partagé au fil de ces années d'internat, je mesure la chance de vous avoir tous rencontrés et je suis certaines que vous serez tous d'excellents biologistes. Mention spéciale à mon super co-prez Kélian et notre tout aussi super secrétaire Pauline.

Au service de Biologie de la Reproduction,

A Elodie et Dorian, mes supers chefs. Merci pour votre accueil au sein du service de BDR, merci pour la qualité de la formation dont j'ai pu bénéficier au fil des semestres parmi vous. Je vous suis infiniment reconnaissante pour tout ce que vous m'avez enseigné, toujours dans la bonne humeur et la sympathie. Les semestres dans votre service ont été les meilleurs de mon internat. Merci également pour la confiance dont vous m'avez toujours témoigné, qui m'a permis de m'épanouir pleinement dans cette discipline que j'aime tant. Je vous en suis extrêmement reconnaissante.

A Séverine, Elodie, Amandine, Audrey, David, Benoit, Jean-Luc et Maud, merci pour votre accueil dans le service et pour la formation technique que vous m'avez transmise. Je suis si heureuse des moments de qualité que j'ai pu passer avec vous. Travailler avec vous a été un immense bonheur et un plaisir au quotidien.

A Laure, Béné, Audrey et Angélique, merci pour votre bonne humeur dès que l'on passe la porte du service. Merci pour les moments de rigolade que nous avons pu partager, je ne les oublierai pas.

Aux Docteurs Cozette, Vandecandelaere, Lourdel et Houette, à Isabelle et Florence, merci pour la sympathie de nos échanges et la bienveillance dont vous avez toujours fait preuve à mon égard.

Au service d'Immunologie,

Anaïs, je suis heureuse d'avoir fait ta connaissance par le biais de ce travail de thèse. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, pour ton soutien tant sur le plan technique que moral. J'ai énormément appris auprès de toi et je t'en suis profondément reconnaissante.

Clara, merci pour ton aide et ton regard toujours bienveillant sur mon travail. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité.

A mes amis,

Aude & Léa, mes amies des années collèges/lycée, je suis heureuse que notre amitié perdure depuis tant d'années et je chéris les moments passés avec vous qui certes sont moins nombreux que dans le passé mais toujours d'une grande richesse.

Maud, Sandrine et Pauline, mes copinettes de danse, vous comptez parmi mes amies est si important pour moi. Merci pour votre soutien durant toutes mes études et merci pour tout ce que vous faites pour moi au quotidien. Vous m'apportez beaucoup et je chéris notre amitié précieusement.

A Nicolas et Louis,

Nicolas, mon évidence, depuis toi ma vie a pris tout son sens. Depuis notre rencontre ton amour et ton soutien indéfectibles sont mes plus grandes forces. Je mesure la chance que j'ai de t'avoir quotidiennement à mes côtés. Merci pour ce que tu es et pour tout ce que tu m'apportes. Je suis impatiente de passer le reste de ma vie à tes côtés.

Louis, mon loulou-filou, ton arrivée dans ma vie a tout chamboulé. Tu es mon plus précieux cadeau. Merci de m'avoir donné ce si beau rôle que d'être ta maman. La douceur et l'apaisement que tu m'apportes remplissent mon cœur au quotidien. J'ai hâte de t'accompagner dans tout ce que tu entreprends.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIÈRES	9
TABLE DES FIGURES	11
TABLE DES TABLEAUX	12
INDEX DES ABRÉVIATIONS	13
INTRODUCTION	15
I/ GÉNÉRALITÉS SUR L'INFERTILITÉ	15
II/ L'INFERTILITÉ MASCULINE	16
LES PRINCIPALES ÉTIOLOGIES	16
LE BILAN DIAGNOSTIQUE DE ROUTINE	17
III/ LA FÉCONDATION DANS L'ESPÈCE HUMAINE	18
LA FÉCONDATION IN VIVO	18
LA FECONDATION IN VITRO	22
LA PHOSPHOLIPASE C ZÊTA	24
IV/ OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	29
MATERIELS ET METHODES	31
I/ TYPE D'ÉTUDE ET POPULATION ETUDIÉE	31
CRITERES D'ÉLIGIBILITÉ	31
COLLECTE DES ÉCHANTILLONS	32
RECUEIL DES DONNÉES PATIENTS	32
II/ RECUEIL ET ANALYSE DES PARAMÈTRES SPERMATIQUES	33
MODALITÉS DE RECUEIL ET PRÉ-ANALYTIQUE	33
NUMÉRATION DES SPERMATOZOÏDES	33
ÉVALUATION DE LA MOBILITÉ	34
ÉVALUATION DE LA VITALITÉ	34

LE SPERMOCYTOGRAMME _____	35
ANALYSES DFI ET SDI _____	35
INTERPRÉTATION DU SPERMOGRAMME _____	36
III/ ANALYSE DE LA PLC ζ EN CYTOMETRIE EN FLUX _____	36
MATÉRIEL ET RÉACTIFS _____	36
PROTOCOLE DE L'ÉTUDE _____	37
LECTURE ET ANALYSE AU CYTOMÈTRE _____	37
ANALYSE STATISTIQUE _____	38
RESULTATS _____	39
I/ ANALYSE DESCRIPTIVE DE LA POPULATION D'INTÉRÊT _____	39
DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES _____	39
PARAMÈTRES SPERMATIQUES _____	40
PARAMETRES DES TENTATIVES DE FIV _____	41
II/ DOSAGE DE LA PLC ζ _____	42
III/ IMPACT DE LA PLC ζ SUR LES PARAMETRES SPERMATIQUES STANDARDS _____	44
COMPARAISON DU TAUX DE PLC ζ CHEZ LES POPULATIONS A SPERME NORMAL ET ANORMAL _____	44
CORRELATION ENTRE LA PLC ζ ET LES PARAMETRES SPERMATIQUES STANDARDS _____	44
III/ IMPACT DE LA PLC ζ SUR LES PARAMETRES DE TENTATIVES EN FIV _____	46
DISCUSSION _____	49
I/ REVUE DE LA LITTERATURE _____	49
II/ LIMITES DE L'ETUDE _____	51
III/ PERSPECTIVES _____	52
CONCLUSION _____	55
ANNEXES _____	57
BIBLIOGRAPHIE _____	61

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : E. de La Rochebrochard 2018 – « 1 enfant sur 30 conçu par assistance médicale à la procréation en France », Population et Sociétés _____	15
Figure 2 : Représentation respectivement d'un ovocyte bloqué en métaphase II, de spermatozoïdes et d'un zygote, tous observés au microscope _____	18
Figure 3 : Représentation de la fixation du spermatozoïde à la zone pellucide _____	19
Figure 4 : Représentation des éléments composants un blastocyste _____	21
Figure 5 : Illustration d'une micro-injection lors d'une technique de FIV-ICSI _____	23
Figure 6 : Stades de développement embryonnaire du premier au cinquième jour _____	23
Figure 7 : Représentation schématique d'un spermatozoïde humain _____	24
Figure 8 : Structure de la PLC ζ _____	25
Figure 9 : Rôle et action de la PLC ζ dans la fécondation humaine _____	26
Figure 10 : Technique d'immunofluorescence indirecte utilisée dans l'analyse de la PLC ζ sur lame _____	28
Figure 11 : Schématisation du principe de la cytométrie en flux _____	29
Figure 12 : Fenêtrage des spermatozoïdes (à gauche) et réalisation d'un overlay (à droite) du tube contrôle négatif (en rouge) et de l'échantillon patient (en vert) _____	42
Figure 13 : Obtention du pourcentage de cellules exprimant la PLC ζ et de la MFI pour le contrôle négatif (à gauche) puis pour le patient (à droite) _____	43
Figure 14 : Algorithme proposé pour prendre en charge les patients faisant face à un échec de fécondation, une polyspermie ou un blocage précoce lors d'une tentative de FIV en AMP _____	53

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales étiologies d'infertilité masculine _____	17
Tableau 2 : Critères d'éligibilité des patients _____	31
Tableau 3 : Données épidémiologiques et spermatiques recueillies _____	32
Tableau 4 : Anticorps primaire et secondaire utilisés pour le marquage de la PLC ζ _____	36
Tableau 5 : Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée _____	40
Tableau 6 : Paramètres spermatiques de la population étudiée _____	40
Tableau 7 : Résultats des tentatives d'AMP obtenues pour la population étudiée _____	41
Tableau 8 : Résultats des spermatozoïdes exprimant la PLC ζ et des MFI obtenues pour la cohorte de patients étudiée _____	43
Tableau 9 : Test de Student comparant le pourcentage de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ et la MFI entre les patients avec spermogramme normal et les patients avec anomalie du spermogramme (* significativité ; $p < 0,05$) _____	44
Tableau 10 : Etude de corrélation entre le % de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ et les paramètres spermatiques (* significativité ; $p < 0,05$; r = coefficient de corrélation) _____	45
Tableau 11 : Etude de corrélation entre la MFI et les paramètres spermatiques _____	46
Tableau 12 : Etude de corrélation entre le % de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ et les résultats de la FIV (* significativité ; $p < 0,05$; r = coefficient de corrélation) _____	46
Tableau 13 : Etude de corrélation entre la MFI et les résultats de la FIV _____	47

INDEX DES ABRÉVIATIONS

ABCD : Agénésie bilatérale des canaux déférents
ACP : Préservation médicale de la fertilité
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ALD : Affection Longue Durée
AMP : Assistance Médicale à la Procréation
AOA : Activation Oocyttaire Artificielle
ATCD : Antécédents
ATP : Adénosine Triphosphate
BDR : Biologie de la Reproduction
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
COFRAC : Comité Français d'Accréditation
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DAG : Diacylglycérol
DFI : DNA Fragmentation Index
FSC : Forward Scatter
FITC : Isocyanate de Fluorescéine
FIV : Fécondation In Vitro
FSH : Follicle-stimulating hormone
GNRH : Gonadotrophine Releasing Hormone
HAS : Haute Autorité de Santé
ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection
IP3 : L'inositol 1,4,5-triphosphate
LH : Luteizing Hormone
MFI : Mean Fluorescence Intensity
OATS : Oligo-asthéo-tératozoospermie
OMS : Organisme Mondial de la Santé
PBS : Phosphate Buffered Saline
PLC ζ : Phospholipase C zêta
PLCZ1 : Gène de la Phospholipase C zêta
PMA : Procréation Médicalement Assistée
SSC : Side Scatter

SDI : Sperm Denaturation Index

TMS : Test de Migration-Survie

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

ZP 1,2,3 : Zona pellucida glycoprotein 1,2,3

INTRODUCTION

I/ GÉNÉRALITÉS SUR L'INFERTILITÉ

Pour un couple hétérosexuel l'infertilité se définit comme une absence de grossesse après une période de 12 mois de rapports sexuels réguliers sans contraception. On estime qu'1/3 à 50% des grossesses se produisent dans les 6 mois d'essais ¹.

L'infertilité touche aujourd'hui 3,3 millions de personnes en France. Cela représente 1 couple sur 4 ^{2,3}. Elle se répartie comme suit : environ 1/4 de cause féminine, 1/4 de cause masculine, 1/4 de cause mixte et 1/4 de cause idiopathique ¹.

C'est en regardant les chiffres actuels en Assistance médicale à la procréation (AMP) que nous comprenons également l'importance sociétale de l'infertilité. Depuis 40 ans, le recours à l'AMP n'a fait que de se développer. Ainsi, si l'on prend en compte la totalité des techniques d'AMP (FIV/ICSI, inséminations artificielles et induction simple de l'ovulation) 3.4% des enfants sont conçus via l'AMP, ce qui représente 1 enfant sur 30 ^{2,4}.

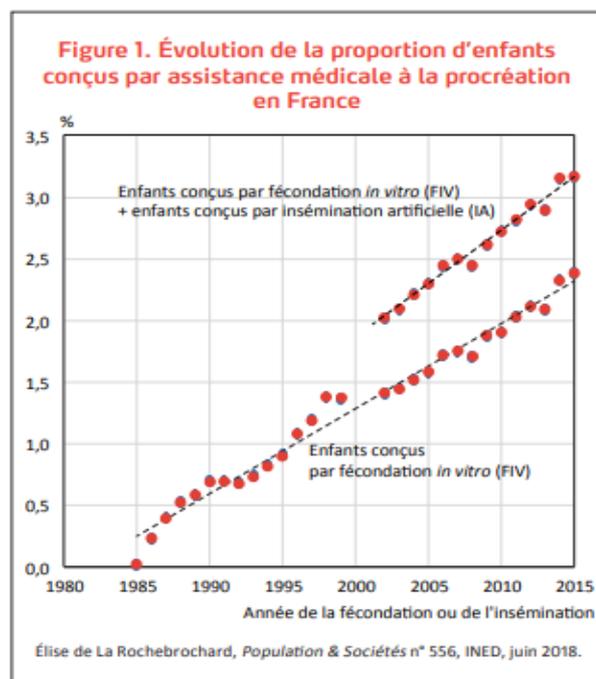


Figure 1 : E. de La Rochebrochard 2018 – « 1 enfant sur 30 conçu par assistance médicale à la procréation en France », Population et Sociétés

II/ L'INFERTILITÉ MASCULINE

LES PRINCIPALES ÉTIOLOGIES

Âge paternel	Accès plus tardif à une première paternité
Causes médicales	<p>Troubles de la spermatogénèse</p> <ul style="list-style-type: none">· azoospermie· oligozoospermie· asthénozoospermie· tératozoospermie· nécrozoospermie <p>Infections uro-génitales</p> <ul style="list-style-type: none">· Chlamydia, Gonocoque· Mycoplasmes uro-génitaux <p>Atteintes génito-urinaires</p> <ul style="list-style-type: none">· varicocèle· torsion testiculaire· traumatisme testiculaire ou de la verge· chirurgie locale ou inguinale <p>Déséquilibres hormonaux</p> <ul style="list-style-type: none">· hypogonadisme hypogonadotrope· hypogonadisme hypergonadotrope· hyperprolactinémie <p>Génétiques</p> <ul style="list-style-type: none">· mutation CFTR (ABCD)· syndrome de Klinefelter· microdélétion du bras long du chromosome Y· syndrome de Kallmann de Morsier· syndrome de Kartagener <p>Sexologiques</p> <ul style="list-style-type: none">· trouble de la libido· troubles de l'érection et/ou éjaculation
Causes environnementales	<p>Toxiques</p> <ul style="list-style-type: none">· tabagisme

- 
- alcool
 - cannabis et autres drogues
 - médicaments
 - polluants
 - pesticides

Surpoids et obésité ou maigreur extrême

Tableau 1 : Principales étiologies d'infertilité masculine

LE BILAN DIAGNOSTIQUE DE ROUTINE

Selon le guide de bonnes pratiques en AMP établi par le Ministère de la santé et de la prévention ⁵, le bilan de première intention en AMP comprends : une anamnèse complète avec reprise des antécédents médicaux personnels et familiaux, en insistant sur les évènements génito-urinaires. En première intention la réalisation d'un spermogramme, d'un spermocytogramme ainsi que d'une spermoculture est recommandée. Un test de migration-survie peut être associé d'emblée si cela est nécessaire.

Le spermogramme permet de déterminer les caractéristiques générales du sperme (aspect, pH, volume et viscosité) et détermine le nombre, la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes présents dans l'éjaculat.

Le spermocytogramme permet d'évaluer la morphologie des spermatozoïdes et le test de migration survie est utilisé pour évaluer le nombre de spermatozoïdes sélectionnables et donc utilisables en technique d'AMP.

S'ajoutent à ces examens un dépistage des sérologies sanitaires suivantes : VIH1 et VIH2, sérologie de dépistage de l'hépatite B (antigène HBs, anticorps anti-HBc et anti-HBs) et de l'hépatite C. Ces sérologies sont obligatoires avant toute tentative d'AMP.

Lorsque le spermogramme présente une anomalie un contrôle est demandé à 3 mois (délai de la spermatogénèse) ainsi qu'un examen clinique andrologique (palpation testiculaire, évaluation des caractères sexuels secondaires etc...). Un bilan hormonal et une échographie testiculaire sont prescrits en complément et permettent une évaluation respectivement de la fonction endocrine testiculaire et du volume testiculaire.

Le bilan hormonal de première intention comprend les dosages de FSH, de testostérone totale et d'inhibine B. En deuxième intention on peut proposer un dosage de prolactine, de LH, de testostérone biodisponible et/ou libre en cas d'hypotestostéronémie avérée ⁶.

Concernant les explorations génétiques, elles sont demandées en cas d'oligozoospermie sévères ou d'azoospermie le plus souvent et consistent en la réalisation d'un caryotype (pour rechercher entre autres le syndrome de Klinefelter) et la recherche de micro-délétions du bras long du chromosome Y.

Ce bilan de base permet de mettre en évidence certaines causes d'infertilité masculine mais ne permet pas toujours de donner une cause, comme pour le cas des infertilités idiopathiques notamment dans l'échec de fécondation.

III/ LA FÉCONDATION DANS L'ESPÈCE HUMAINE

LA FÉCONDATION IN VIVO

Dans l'espèce humaine, la fécondation correspond au processus de rencontre et de fusion de deux cellules matures haploïdes issues de la gamétogénèse : le spermatozoïde (gamète masculin) et l'ovocyte (gamète féminin). Elle aboutit à la formation du zygote, cellule unique diploïde et totipotente. Ce zygote formera ensuite un embryon par division mitotiques multiples.



Figure 2 : Représentation respectivement d'un ovocyte bloqué en métaphase II, de spermatozoïdes et d'un zygote, tous observés au microscope

Lors d'un rapport sexuel, les spermatozoïdes déposés dans le vagin évoluent en direction du col de l'utérus et remontent en direction des trompes de Fallope. C'est dans le tiers externe de la trompe, au niveau de l'ampoule tubaire, qu'a lieu la fécondation.

Cette traversée des voies génitales féminine permet la capacitation des spermatozoïdes en permettant d'éliminer le liquide séminal, de filtrer les spermatozoïdes morts ou immobiles et de sélectionner et capaciter les spermatozoïdes féconds.

Plusieurs spermatozoïdes atteignent alors l'ovocyte qui est considéré mature s'il est bloqué au stade de métaphase II (c'est à dire qu'il a expulsé un premier globule polaire).

a) L'interaction gamétique

L'ovocyte ovulé est entouré du cumulus oophorus, ensemble de cellules folliculaires enchâssées dans une matrice acellulaire, riche en acide hyaluronique. Une fois qu'ils ont atteint l'ovocyte, les spermatozoïdes capités entament la traversée du cumulus oophorus. Lorsqu'ils atteignent la zone pellucide, ils se lient à celle-ci. La zone pellucide se compose de glycoprotéines dont 4 ont été identifiées dans l'espèce humaine : ZP1, ZP2, ZP3 et ZP4 (ZP pour Zona Pellucida Glycoprotein) ⁷. Les trois dernières forment une trame dont la liaison est assurée par ZP1.

La fixation à la zone pellucide se fait en plusieurs étapes. La fixation primaire du spermatozoïde par son capuchon acrosomial se fait grâce à ZP3 et ZP4 (l'acrosome est encore intact). La fixation secondaire a lieu grâce à ZP2 (acrosome activé). In vivo, quelques spermatozoïdes voire un seul sont fixés à la zone pellucide.

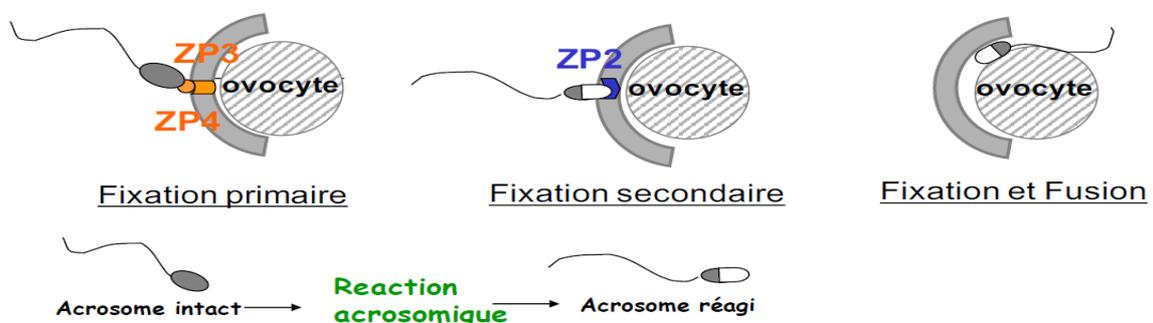


Figure 3 : Représentation de la fixation du spermatozoïde à la zone pellucide

La réaction acrosomique a ensuite lieu, engagée grâce à une cascade calcium-dépendante. L'acrosome est un granule sécrétoire dérivé de l'appareil de Golgi et recouvrant les 2/3 antérieurs du noyau spermatique. La réaction acrosomique est induite par la ZP3.

Cette réaction acrosomique permet ensuite au spermatozoïde de pénétrer dans la zone pellucide et cette étape s'accompagne d'une libération d'enzymes par exocytose : la hyaluronidase et l'acrosine parmi les plus connues. Ces enzymes concourent à faire pénétrer le spermatozoïde au travers de la zone pellucide.

Une fois la zone pellucide traversée, le spermatozoïde pénètre dans l'espace péri-vitellin et fusionne à la membrane plasmique ovocytaire au niveau de son segment équatorial pour ensuite atteindre le cytoplasme ovocytaire.

b) L'activation ovocytaire

Sous le terme d'activation ovocytaire, sont rassemblées l'ensemble des modifications moléculaires, structurales et morphologiques au niveau du noyau et du cytoplasme ovocytaire permettant la réalisation du premier cycle cellulaire. Cette activation ovocytaire est déclenchée par un facteur d'activation spermatique appelé Phospholipase C zêta (PLC ζ).

La PLC ζ contenue dans l'acrosome est libérée dans l'ovocyte lors de la pénétration du spermatozoïde dans celui-ci.

L'activation ovocytaire va permettre une élévation du calcium intra-ovocytaire permettant la fusion des granules corticaux d'origine ovocytaire avec la membrane plasmique ovocytaire et l'exocytose des enzymes hydrolytiques (protéases, peroxydases et glycosaminoglycanes).

Cette étape est appelée la réaction corticale. Les granules corticaux sont des vésicules sécrétoires situées juste en dessous de la membrane plasmique ovocytaire. Les enzymes hydrolytiques ovocytaires libérées dans l'espace périvitellin provoquent une imperméabilisation de la zone pellucide à d'autres spermatozoïdes, bloquant ainsi la polyspermie et un durcissement de la zone pellucide permettant la protection du zygote en formation.

Une fois entré dans le cytoplasme ovocytaire, le noyau spermatique se décondense (les protamines sont remplacées par des histones). Une nouvelle enveloppe nucléaire se forme à partir de vésicules du réticulum endoplasmique spermatique entraînant la formation du pronucléus mâle.

L'ovocyte bloqué en métaphase II achève alors sa deuxième division méiotique en expulsant un second globule polaire et le pronucléus femelle se forme alors en regard de celui-ci.

Concernant les mitochondries, celles d'origine paternelles sont dégradées et celles d'origine maternelles persistent dans le zygote.

Les pronucléi se rapprochent, leurs membranes nucléaires se fragmentent et les chromosomes paternels et maternels se condensent et se placent sur la plaque équatoriale du fuseau de première division mitotique. Ce stade est appelé stade de syngamie et survient environ 30 heures après la mise en contact des gamètes. Ce stade signe l'achèvement de la fécondation et le début du développement embryonnaire.

c) Le développement embryonnaire précoce

L'ovocyte commence ses premières divisions environ 24 heures après la fécondation. Chaque nouvelle cellule est ainsi deux fois plus petite que la cellule dont elle est issue. Vers 96 heures après la fécondation, l'embryon atteint le stade de morula (ou petite mûre). A ce stade l'embryon est composé d'un amas d'une trentaine de cellules appelées blastomères.

Une paroi cellulaire se forme et les cellules s'adjoignent entre elles à l'aide de tight et de gap junctions. Au centre de l'embryon appelé alors blastocyste, se forme une cavité liquidienne : le blastocèle. Les cellules les plus internes se développent pour former la masse cellulaire interne ou bouton embryonnaire (à partir de laquelle le futur fœtus se développera).

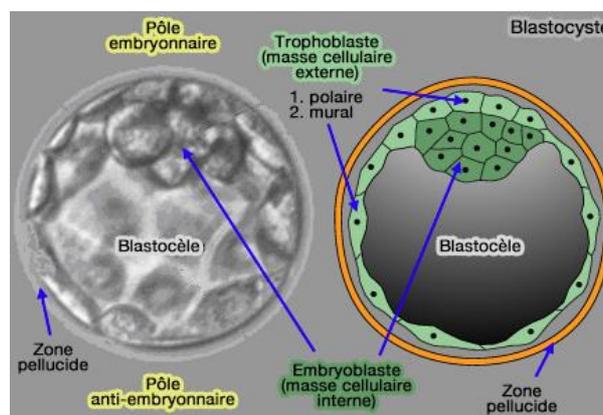


Figure 4 : Représentation des éléments composants un blastocyste

LA FECONDATION IN VITRO

a) Généralités

La fécondation in vitro, plus communément appelée « FIV », est une technique de procréation médicalement assistée consistant à prélever chez une femme un ou plusieurs ovocytes, à les féconder artificiellement en laboratoire avec les spermatozoïdes de son conjoint ou d'un donneur de sperme, puis de le replacer dans la cavité utérine de cette même femme.

Il existe en France deux techniques principales, la FIV dite « classique » et la FIV avec « ICSI » pour *Intracytoplasmic Sperm Injection*. Les deux techniques font suite à une étape de ponction ovocytaire réalisée au bloc opératoire sous anesthésie générale ou locorégionale. Le recueil spermatique du conjoint ou la paillette de sperme du donneur sont préparés en parallèle de la ponction ovocytaire.

La fécondation est ensuite réalisée, pour la FIV classique, les gamètes sont mises en contact dans un puits de culture pour une durée de 2 à 4 heures. Au bout de ce temps d'incubation, les ovocytes sont isolés dans des boîtes de cultures séparées, identifiées au nom du patient.

Le lendemain, ils sont décoronés, c'est-à-dire que la corona radiata entourant l'ovocyte est mécaniquement retirée grâce à une micropipette, et le technicien d'AMP évalue alors le statut fécondé ou non fécondé de l'ovocyte. Pour la FIV avec ICSI (autrement appelée avec microinjection), les ovocytes matures sont décoronés chimiquement en amont de la fécondation, puis, le technicien ou le biologiste procède à la fécondation sous microscope, à l'aide d'une pipette de contention qui maintient l'ovocyte en place et d'une pipette d'injection qui permet la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte.

Le choix entre FIV classique et FIV-ICSI se fait sur les paramètres spermatiques et surtout sur la mobilité spermatique, déterminante dans la FIV classique. La technique de FIV-ICSI permet en effet au biologiste ou au technicien d'analyser au microscope la morphologie et le déplacement du spermatozoïde choisi.

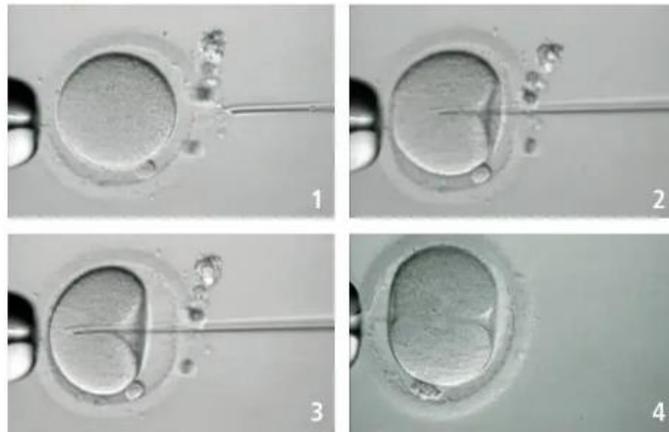


Figure 5 : Illustration d'une micro-injection lors d'une technique de FIV-ICSI

À la suite de la fécondation in vitro, vient l'étape de la culture embryonnaire. La culture embryonnaire in vitro se fait dans des incubateurs trigaz type MIRI® (Esco Medical Technologies, Kaunas, Lituanie). Ces incubateurs permettent de fournir un environnement de culture stable au plus proche des conditions corporelles habituelles.

La culture embryonnaire in vitro s'étend du premier jour post-fécondation appelé « J1 » au 5ème ou 6ème jour post-fécondation appelés respectivement « J5 » et « J6 ».

Les différents stades de culture sont représentés ci-dessous (à l'exception du stade morula à J4)

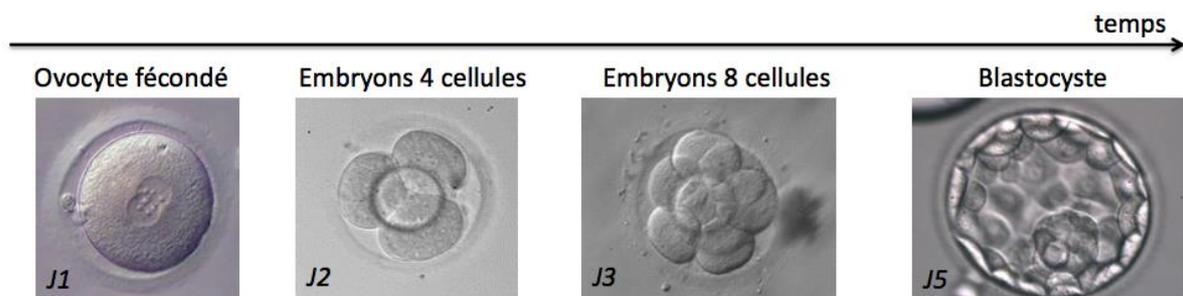


Figure 6 : Stades de développement embryonnaire du premier au cinquième jour

A l'issue de la culture embryonnaire, à J3 ou à J5, les embryons de qualité suffisante sont replacés dans la cavité utérine de la patiente à l'aide d'un fin cathéter. Les blastocystes obtenus à J6 de culture sont tous congelés en raison d'une inadéquation entre le stade de culture et l'épaisseur de l'endomètre utérin empêchant un transfert à l'issue de la tentative.

b) Les échecs de fécondation en FIV

Une étude rapporte que les échecs partiels ou totaux de fécondation représentent environ 5 à 20% des cycles de FIV classique. En FIV-ICSI ce taux avoisine les 5%⁸.

Les échecs de fécondation en FIV classique sont la plupart du temps liés à un âge féminin avancé ou à des anomalies des paramètres spermatiques^{9 10}.

Alors qu'en FIV-ICSI, le défaut d'activation ovocytaire est plus fréquemment observé.

Dans les deux cas (FIV classique ou FIV-ICSI), la survenue d'un échec total de fécondation est corrélée au nombre d'ovocytes ponctionnés et d'ovocytes matures^{11 12}.

LA PHOSPHOLIPASE C ZËTA

a) Localisation

C'est en 2002 que Saunders¹³ met en évidence la PLC ζ . C'est une protéine d'environ 70kD et qui constitue la plus petite isoforme de la famille des phospholipases C. Les phospholipases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons esters des phospholipides et elles se distinguent selon leur site d'action sur la molécule.

La PLC ζ est exprimée dans des zones bien identifiées du spermatozoïde humain : l'acrosome, la plaque équatoriale et en zone post-acrosomique de la tête du spermatozoïde. Des localisations associées ont également été mises en évidence : zone acrosomale + zone post-acrosomale ; zone acrosomale + zone équatoriale ; zone équatoriale + zone post-acrosomale ainsi que zone acrosomale + zone équatoriale + zone post-acrosomale^{14,15}. Le spermatozoïde humain possède une tête ovoïde de 5 μ m et un flagelle d'une longueur d'environ 50 μ m.

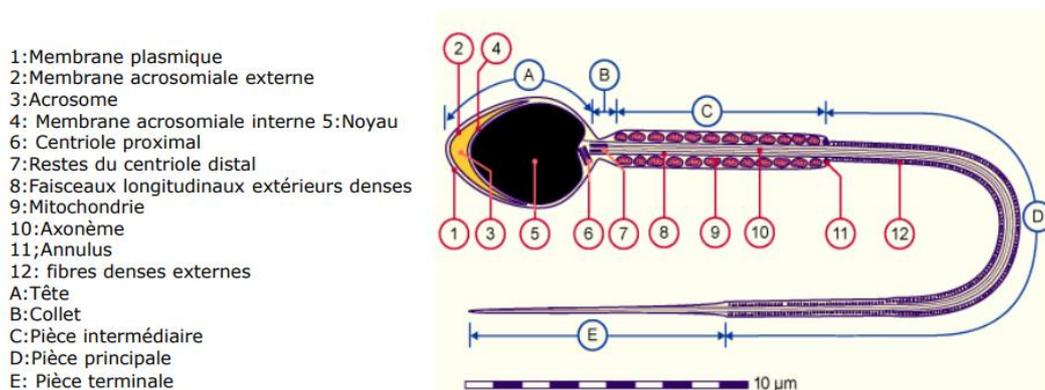


Figure 7 : Représentation schématique d'un spermatozoïde humain

b) Structure

La PLC ζ se compose de 4 modules clés. Les quatre domaines EF Hands situés à la partie N-terminale de la PLC ζ lui confèrent sa sensibilité aux taux de calcium dans l'ovocyte et lui permettent ainsi de s'activer malgré des taux bas de calcium intracytoplasmiques. La perte d'une paire ou deux de ces domaines conduit à une perte complète de l'induction des oscillations calciques¹⁶, nécessaires à l'activation ovocytaire. Ces domaines servent également à l'ancrage de la PLC ζ dans la membrane phospholipidique et facilite donc son mode d'action.

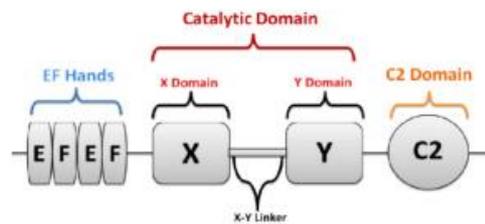


Figure 8 : Structure de la PLC ζ

Les domaines catalytiques X et Y forment le site actif commun à toutes les formes de phospholipases [3],¹⁷ et sont indispensables au fonctionnement correct de la PLC ζ car ils induisent son activité enzymatique à savoir l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) pour produire le calcium en mobilisant l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). La région XY linker est située entre ces deux domaines. Sa délétion diminuera l'hydrolyse du PI(4,5)P₂.

Le domaine terminal, C2, intervient dans la fixation membranaire. Lorsqu'il est inactivé il conduit à une perte d'activité enzymatique de la PLC ζ sans pour autant diminuer sa sensibilité au calcium. Dans certaines études pourtant, la micro-injection de PLC ζ privée de son domaine C2 dans des ovocytes de souris, ne permet pas de déclencher les oscillations calciques, suggérant que le domaine C2 terminal joue un rôle important dans la fonction de la PLC ζ ¹⁸.

c) Rôle de la PLC ζ dans la fécondation

Saunders et al. a montré en 2002 que la présence de la PLC ζ au sein du spermatozoïde permet l'activation de l'ovocyte fécondé en déclenchant une augmentation du taux de calcium cytoplasmique appelée « oscillations calciques »¹³.

Celle-ci va hydrolyser le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂), libérant ainsi un diacylglycérol (DAG) et un inositol tri-phosphate (IP₃). La liaison de l'IP₃ à son canal-récepteur situé dans le réticulum endoplasmique entraîne la libération des stocks de calcium. Cette libération se fait par vagues qui permettront l'activation de l'ovocyte avec la reprise de la méiose et libération du second globule polaire, la libération des granules corticaux assurant le blocage de la polyspermie et l'apposition des deux pronucléi suivi des premières divisions mitotiques de l'embryon ¹⁸.

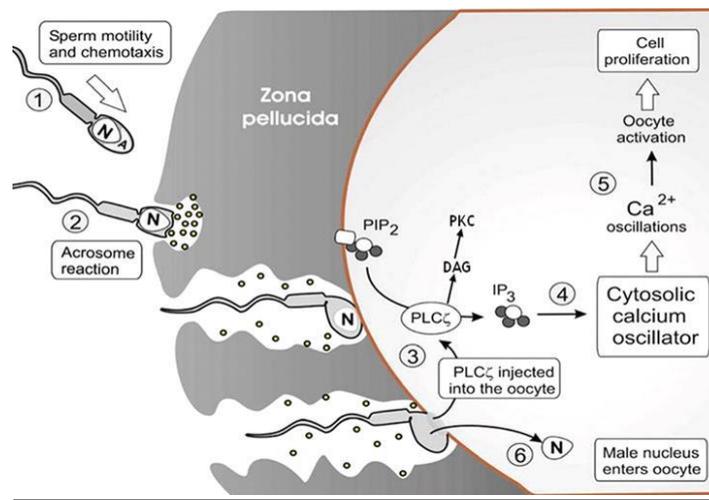


Figure 9 : Rôle et action de la PLCζ dans la fécondation humaine

Plusieurs études s'accordent sur le fait que lors d'une technique d'ICSI chez la souris avec inactivation de la PLCζ chez les mâles, l'activation ovocytaire par oscillations calciques est déficiente ^{19,20}. Cependant lors d'une technique de FIV classique avec ces mêmes souris, ils ont observé une activation ovocytaire et un développement embryonnaire. Les taux de développement embryonnaire sont cependant plus bas que la normale car dans ces cas-ci la polyspermie n'est pas empêchée. L'activation ovocytaire semble cependant arriver plus tardivement que lorsque la PLCζ n'est pas inactivée. Cette étude suggère qu'en cas de technique par FIV classique, il existe d'autres facteurs présents qui concourent à provoquer ces oscillations calciques.

Deux études distinctes ^{21,22} ont tout de même montré que cette étude est à différencier des conditions chez l'homme car les ovocytes de souris sont plus sensibles aux oscillations calciques que les ovocytes humains en raison d'un taux plus haut d'ATP.

Ceci fait de la PLCζ, surnommée « sperm factor » une protéine centrale dans l'activation ovocytaire, la fécondation et l'initiation du développement embryonnaire qui s'en suit.

d) Mutations du gène de la PLC ζ

Le gène de la PLC ζ (PLCZ1) a été étudié chez les patients pour qui des échecs de fécondation ont été obtenus à la suite d'une prise en charge en AMP. De multiples mutations de ce gène ont été mises en évidence à ce jour et elles touchent les différents domaines de la protéine.

Ces mutations n'altèrent pas la mobilité ou la morphologie spermatozoïdes mais sont responsables d'échecs de fécondation ¹⁴.

Dans une étude de 2023 une nouvelle mutation du gène PLCZ1 (c.2 T>C (p.Met1Thr)/c.590G>A (p.Arg197His)) a été mise en évidence et est responsable de polyspermie ²³. Ces mutations diminuent l'action de la PLC ζ et induisent donc l'absence de libération des granules corticaux et augmentent la perméabilité membranaire, tout ceci concourant à promouvoir la polyspermie. L'utilisation de l'activation ovocytaire artificielle chez ces couples a permis de conduire à des grossesses évolutives par la suite.

Une autre équipe a mené une étude qui a mis en évidence qu'une mutation bi-allélique du gène PLCZ1 induisait des taux de développements embryonnaires plus bas et des arrêts de développements embryonnaires plus fréquents en ICSI, en plus d'un fort risque de polyspermie ²⁴.

Très récemment, le laboratoire du centre de médecine de la reproduction de Chongqing Key en Chine a mis en évidence une nouvelle mutation familiale du gène PLCZ1 responsable de polyspermie et d'échec de FIV. A noter que les paramètres spermatozoïdes masculins étaient normaux et que les conjointes n'étaient pas atteintes d'altération de la fonction ovarienne ²⁵.

Aujourd'hui, la seule option thérapeutique qui peut être proposée en cas d'échec de fécondation en FIV est l'Activation Ovocytaire Artificielle (AOA). L'AOA consiste en l'adjonction de calcium ionophore dans le milieu de culture après la technique de fécondation dans le but de mimer l'activation ovocytaire initiée par le spermatozoïde.

Elle n'est pour le moment pas réglementée en France. Des études sont en cours quant à l'utilisation d'une PLC ζ humaine recombinante pour induire les oscillations calciques observées physiologiquement lors de la fécondation mais à l'heure actuelle nous manquons de solution pour pallier les échecs de fécondation en AMP.

e) Méthode de dosage actuelle

A l'heure actuelle, l'analyse par immunofluorescence indirecte est la technique de référence pour évaluer le niveau d'expression de la PLC ζ . Les spermatozoïdes sont fixés sur lame et perméabilisés puis ils sont mis en contact avec des anticorps anti-PLC ζ qui vont s'hybrider à la protéine si celle-ci est présente. Si la protéine est présente, un complexe antigène-anticorps se formera alors. Une étape de lavage a lieu, puis on incube un second anticorps (spécifique du premier) qui, lui, est couplé à un fluorochrome (FITC).

Lors de la lecture des lames, au microscope à fluorescence, si la fluorescence est verte, cela signe la présence de la protéine PLC ζ . Un intercalant ADN double brin, le DAPI, est également appliqué pour permettre de colorer en bleu le noyau des spermatozoïdes et ainsi de permettre un meilleur repérage de la PLC ζ .

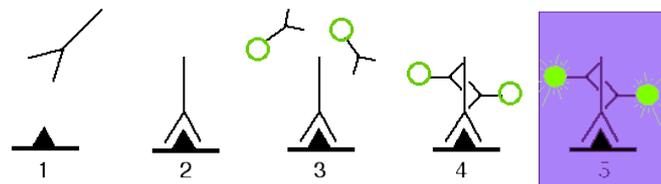


Figure 10 : Technique d'immunofluorescence indirecte utilisée dans l'analyse de la PLC ζ sur lame

Les limites de cette technique sont la faible quantité de spermatozoïdes évalués ainsi que les erreurs de jugement quant à la fluorescence observée (opérateur dépendant).

L'utilisation de la cytométrie en flux pourrait permettre de palier à ces deux limites techniques rencontrées.

f) Principes de base de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique de mesure de cellules en suspension dans un milieu liquide. Les cellules d'intérêt sont entraînées par un flux créé par un liquide de gaine (le sheath) et passent devant une source laser. En passant devant ce laser, elles émettent un signal de diffraction qui va être mesuré à l'aide de détecteurs et qui va donner des informations de taille, de structure et sur les propriétés fluorescentes de cette cellule d'intérêt. La dimension et la granularité des cellules peuvent être respectivement déterminées en fonction des caractéristiques de leur dispersion lumineuse frontale (FSC pour Forward Scatter) et latérale (SSC pour Side Scatter).

La fluorescence mesurée dépendra du type de fluorochrome utilisé. Chaque fluorochrome émet à une longueur d'onde précise et il est possible d'analyser jusqu'à 17 couleurs simultanément. Ces fluorochromes peuvent être spécifiques d'un organelle ou d'un composé de la cellule d'intérêt.

Dans ce travail, nous utiliserons la taille et la granulométrie afin d'identifier les spermatozoïdes dans notre échantillon. Le marquage préalable de la PLCz par une combinaison d'anticorps fluorescents permettra alors d'évaluer l'expression de la protéine par les spermatozoïdes.

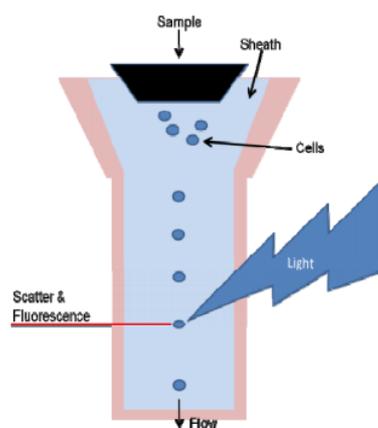


Figure 11 : Schématisation du principe de la cytométrie en flux

IV/ OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Notre étude a pour objectif principal de mettre au point, en routine, une technique de dosage de la PLC ζ par cytométrie en flux au CHU d'Amiens Picardie afin de compléter le bilan d'infertilité masculine de base et d'apporter une aide diagnostique supplémentaire aux patients confrontés à des échecs de tentative en FIV.

L'objectif secondaire serait d'évaluer s'il existe une association entre le taux de PLC ζ et les paramètres spermatiques des patients ainsi qu'avec les paramètres de la FIV.

MATERIELS ET METHODES

I/ TYPE D'ÉTUDE ET POPULATION ETUDIÉE

Notre étude a été soumise à la Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation (DRCI) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Amiens-Picardie, la classant MR-004 « Recherches n'impliquant pas la personne humaine, études et évaluations dans le domaine de la santé » et portant le numéro d'enregistrement suivant : PI2023_843_0101.

Il s'agit d'une étude prospective, longitudinale et monocentrique, menée au CHU d'Amiens-Picardie dans le centre de Médecine et Biologie de la Reproduction entre mars 2024 et août 2024, en étroite collaboration avec le Laboratoire d'Immunologie.

CRITERES D'ÉLIGIBILITÉ

Critères d'inclusion	Critères d'exclusion
<ul style="list-style-type: none">▪ Sexe masculin▪ Patients âgés de 18 à 60 ans▪ Patients venus pour un examen de spermologie diagnostique ou thérapeutique	<ul style="list-style-type: none">▪ Patients âgés de moins de 18 ans ou de plus de 60 ans▪ Patients venus pour la réalisation d'une insémination-intra-utérine (IIU)▪ Spermies de donneurs▪ Spermies congelés▪ Sperme de patients présentant une éjaculation rétrograde▪ Patients s'opposant à l'utilisation de leurs données médicales dans le cadre de la recherche

Tableau 2 : Critères d'éligibilité des patients

COLLECTE DES ÉCHANTILLONS

L'inclusion des patients s'est étendue de mars à août 2024. Nous avons choisi de travailler sur sperme entier et chaque échantillon récolté pour notre étude correspond au prélèvement résiduel d'une analyse des paramètres spermatiques de routine. Les échantillons ont été techniques le jour du recueil et ils ont été anonymisés pour le bien de l'étude avant d'être traité.

RECUEIL DES DONNÉES PATIENTS

Pour chaque patient les données épidémiologiques et les paramètres spermatiques ont été recueillis respectivement à l'aide des logiciels MédiFirst© (Montigny-le-Bretonneux, France) et DxLAB® (Dedalus, Florence, Italie) et sont présentées ci-dessous.

Données épidémiologiques	Age
	Type d'infertilité (primaire ou secondaire)
	IMC (<i>en kg/m²</i>)
	Exposition toxique : Tabac, alcool, cannabis
	Risque viral (VIH, VHB, VHC)
Paramètres spermatiques	Délai d'abstinence (<i>en jours</i>)
	Aspect
	Viscosité
	pH
	Volume (<i>mL</i>)
	Concentration spermatique <i>en M/mL</i>
	Numération spermatique <i>en M/éjaculat</i>
	Mobilité A + B (%) (progressifs)
	Vitalité (%)
	Présence d'agglutinats et/ou agrégats
	Présence de cellules rondes <i>en M/mL</i>
	% de formes typiques (selon Krüger)
	Spermoculture
	DFI – SDI

Tableau 3 : Données épidémiologiques et spermatiques recueillies

II/ RECUEIL ET ANALYSE DES PARAMÈTRES SPERMATIQUES

MODALITÉS DE RECUEIL ET PRÉ-ANALYTIQUE

L'identité du patient est vérifiée à l'aide d'un document d'identité valide au moment de l'entrée en salle de recueil après avoir été vérifiée une première fois lors de l'enregistrement à l'accueil du patient au secrétariat. Le recueil de sperme est obtenu au laboratoire après un protocole standardisé de désinfection des mains et de la verge ayant pour objectif de limiter la contamination bactérienne du prélèvement par la flore commensale. Le recueil s'effectue ensuite par masturbation dans un réceptacle dédié dont le lot est tracé par étiquette sur chaque feuille de travail.

Ce recueil est précédé d'un court interrogatoire où sont demandés au patient : son délai d'abstinence (qui doit être entre 2 et 5 jours), ses traitements actuels et s'il a présenté de la fièvre ou voyagé récemment au cours des jours précédant l'examen. Un questionnaire plus détaillé est soumis aux hommes ayant une analyse de DFI (DNA Fluorescence Index) et/ou SDI (Sperm Denaturation Index) permettant ainsi une évaluation plus précise de leur exposition à des toxiques environnementaux et caustiques (Voir Annexe 1).

NUMÉRATION DES SPERMATOZOÏDES

Elle est effectuée sous microscope (Eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japon) après avoir analysé l'aspect, la viscosité, le pH et le volume de l'éjaculat, tout ceci après une étape de liquéfaction du sperme à température ambiante pendant environ 30 minutes à 1 heure.

En premier lieu une évaluation initiale de la concentration spermatique est réalisée sur deux dépôts de 10 μ L. Cette évaluation de la concentration permet de choisir la dilution qui sera appliquée avant comptage. Plus la concentration spermatique paraît élevée, plus la dilution sera forte et inversement.

Dans un tube conique est déposé 50 μ L de sperme auquel est ajouté le volume d'eau nécessaire à la dilution. 20 μ L de ce mélange est ensuite prélevé et déposé par capillarité dans une chambre d'une cellule de KOVA® (Labelians, Nemours, France). Il est nécessaire de laisser le mélange reposer quelques minutes avant lecture.

Le compte s'effectue au grossissement x40, et les spermatozoïdes comptés sont ceux se situant au sein des petits carrés (on exclut ceux situés sur les bords de la grille).

Il est nécessaire de compter au moins 200 spermatozoïdes et de retenir le nombre de carreaux comptés.

Le calcul de numération s'effectue ensuite par la formule suivante :

$$\text{Numération}/\mu\text{L} = n \times 81 \times 1,1 \times \text{dilution} = n \times 90 \times \text{dilution}$$

n correspondant au nombre de spermatozoïdes par carreaux comptés.

81 : nombre de petits carrés pour une cellule de KOVA® (Labelians, Nemours, France).

1,1 : facteur appliqué pour tenir compte des spermatozoïdes sur les traits de la grille.

Le résultat est ensuite multiplié par 1000 pour obtenir un résultat en millions de spermatozoïdes par mL. La numération est ensuite rapportée au volume d'éjaculat pour obtenir le nombre total de spermatozoïdes, en millions, contenu dans l'éjaculat.

ÉVALUATION DE LA MOBILITÉ

La mobilité est évaluée au microscope optique en pourcentage de spermatozoïdes mobiles sur deux dépôts de 10 μ L entre lame et lamelle.

On distingue 4 types de mobilité :

- Type a : rapide et progressif, dit fléchant (trajectoire rectiligne)
- Type b : lent ou faiblement progressif (plus faible vitesse, trajectoire rectiligne ou non)
- Type c : mobile non progressif, oscillations de la tête et du flagelle sur place
- Type d : aucun déplacement, immobilité de la tête et du flagelle

Cette évaluation repose soit sur un compte de 100 à 200 spermatozoïdes en cas de concentration faible soit sur une estimation en cas de concentration élevée de spermatozoïdes. Une moyenne des deux comptes (un par dépôt) obtenus est faite par la suite. En cas de trop grosse différence entre les deux comptes la mobilité doit être refaite sur deux nouveaux dépôts.

ÉVALUATION DE LA VITALITÉ

La vitalité est évaluée indirectement par évaluation de l'intégrité membranaire du spermatozoïde. Nous utilisons le kit VitalScreen® (JCD, La Mulatière, France). Il est nécessaire de déposer 50 μ L de sperme homogénéisé au préalable dans un tube stérile, puis d'ajouter deux gouttes d'éosine et mélanger. Il faut ensuite attendre 30 secondes puis ajouter trois gouttes de nigrosine et mélanger de nouveau. Attendre de nouveau 30 secondes, puis placer une goutte de ce mélange sous lame/lamelle.

Il faut ensuite compter sur 100 spermatozoïdes le nombre de vivants (non colorés) et le nombre de morts (colorés en rose/rouge). La vitalité est considérée normale si le nombre de

spermatozoïdes vivants est supérieur ou égal à 54%. En dessous de ce chiffre on parle de nécrozoospermie.

LE SPERMOCYTOGRAMME

Il correspond à l'étape d'évaluation morphologique des spermatozoïdes au microscope. Son but est de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux en respectant la classification de Krüger.

Ce décompte s'effectue après coloration d'un frottis de 10µL de sperme par le kit RAL 555® (Labelians, Nemours, France) avec une étape de fixation au méthanol, une étape de coloration à l'éosine et par du bleu de méthylène ensuite.

La lame de frottis est ensuite étudiée au microscope x100 avec huile à immersion.

On compte au moins 100 spermatozoïdes en respectant la classification de Krüger. Le nombre normal de formes typiques est fixé à un résultat supérieur ou égal à 4%. Si le résultat est de moins de 4% on parle alors de tératozoospermie.

ANALYSES DFI ET SDI

L'analyse de la DFI correspond à la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN spermatique par la technique TUNEL. Cette étape est réalisée après un TMS, et consiste à visualiser les fragments d'ADN simple ou double brin par fixation d'UTP (deoxyuridine triphosphate) couplé à un fluorochrome (FITC : isocyanate de fluorescéine) à l'aide d'une enzyme : la TdT pour terminal deoxynucleotidyl transferase.

La lame est lue au microscope à fluorescence (Axioplan 2 imaging, Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) avec filtre DAPI et FITC avec l'objectif à immersion. Un compte de 200 spermatozoïdes est nécessaire. Le résultat est rendu en pourcentage de spermatozoïdes fragmentés.

L'analyse de la SDI ou dénaturation de l'ADN spermatique correspond à la mise en évidence de la condensation de l'ADN des spermatozoïdes grâce au bleu d'aniline. Elle permet de définir un indice de décondensation déterminant l'intégrité et la qualité de l'ADN spermatique.

Le bleu d'aniline est un marqueur d'immaturation des spermatozoïdes et la coloration de leur tête va indiquer le degré de condensation de la chromatine : les bleus clairs ont une chromatine condensée, les bleus foncés ont une chromatine décondensée.

200 spermatozoïdes sont comptés au total et le chiffre de spermatozoïdes bleu foncé, donc à chromatine décondensée, sont rapportés sur la feuille de travail en pourcentage.

INTERPRÉTATION DU SPERMOGRAMME

Le spermogramme est considéré anormal si l'un des paramètres ou plus n'est pas dans les normes d'après les normes du spermogramme selon l'OMS 2021 (voir Annexe 2).

En fonction du paramètre concerné, on parle d'hypospermie lorsque le volume est inférieur à 1,4 mL, d'oligozoospermie lorsque la concentration spermatique est inférieure à 16 M/mL, d'asthénozoospermie lorsque la mobilité a+b est inférieure à 30% ou que la mobilité totale a+b+c est inférieure à 42%, de nécrozoospermie lorsque la vitalité est inférieure à 54%.

Une morphologie spermatique selon les critères de Krüger inférieure à 4% signe une tératozoospermie.

Se distinguent également l'azoospermie qui est l'absence totale de spermatozoïdes et la cryptozoospermie qui est l'absence de spermatozoïdes à l'examen direct mais la présence de spermatozoïdes après centrifugation du recueil et analyse du culot obtenu.

III/ ANALYSE DE LA PLC ζ EN CYTOMETRIE EN FLUX

MATÉRIEL ET RÉACTIFS

Anticorps marqués utilisés dans ce protocole :

Type d'anticorps	Isotype	Fluorochrome	Volume	Référence
Primaire	IgG	-	1 mg/mL	Abcam 181816 Rabbit anti-Human (Cambridge, Royaume-Uni)
Secondaire	IgG	FITC	1-2 mg/mL	Abcam ab97050 Goat anti Rabbit (Cambridge, Royaume-Uni)

Tableau 4 : Anticorps primaire et secondaire utilisés pour le marquage de la PLC ζ

Les autres réactifs utilisés sont à retrouver en Annexe (voir Annexe 3).

PROTOCOLE DE L'ÉTUDE

Le calcul du volume d'échantillon nécessaire en μL a été réalisé pour obtenir au moins 6 000 évènements au cytomètre selon cette formule :

$$\text{Volume d'échantillon } (\mu\text{L}) = \frac{6\ 000}{\text{Concentration en spermatozoïdes (M/mL)}}$$

Le volume calculé a été déposé dans un tube à hémolyse (1 tube par patient) puis il a été ajusté à 1,5 mL avec du PBS. Les spermatozoïdes ont tout d'abord été fixés avec une solution de formaldéhyde à 3,7% puis perméabilisés avec une solution associant du citrate de sodium et du triton X-100. Les échantillons ont par la suite été traités à la BSA (Bovin Serum Albumin) puis divisés en deux tubes de 100 μL chacun, un tube appelé « tube échantillon Px » et un tube appelé « contrôle négatif Px » (Px correspondant au patient suivi de son numéro d'anonymat).

50 μL d'anticorps primaire ont été ajoutés à chaque tube « échantillon Px » tandis que 50 μL de solution de blocage a été ajouté à chaque tube « contrôle négatif Px ». Tous les tubes ont ensuite été incubés à 4°C jusqu'au lendemain. Le lendemain, après lavage, incubation de tous les échantillons (Px et contrôle négatif) avec l'anticorps secondaire.

LECTURE ET ANALYSE AU CYTOMÈTRE

L'analyse des échantillons est effectuée en cytométrie en flux sur le cytomètre DxFLEX (Beckman Coulter, Pasadena, Californie USA).

Les spermatozoïdes ont été sélectionnés sur leur taille et leur granularité puis nous avons procédé à l'évaluation du pourcentage de cellules exprimant la PLC ζ et de la Mean Fluorescence Intensity (MFI) qui correspond à la fluorescence moyenne par cellule.

ANALYSE STATISTIQUE

Les données obtenues ont été analysées par corrélation de Spearman en utilisant les logiciels GraphPad Prism (San Diego, Californie, USA) et Orange Data Mining (Ljubljana, Slovénie).

Dans un second temps nous avons analysé les données en utilisant le test de Student pour comparer le groupe de patients avec sperme normal et le groupe avec sperme anormal.

RESULTATS

I/ ANALYSE DESCRIPTIVE DE LA POPULATION D'INTÉRÊT

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Dans notre étude, les cinquante hommes inclus étaient tous âgés de 21 à 48 ans, avec un âge moyen de 33 ans. Seize d'entre eux (32%) présentaient une infertilité qualifiée de secondaire c'est à dire qu'ils avaient au moins un enfant né vivant au moment de l'étude.

L'indice de masse corporel moyen des patients de la cohorte était de 25,2 kg/m² soit un IMC considéré comme étant en surpoids.

L'exposition toxique la plus fréquemment rencontrée dans la population était le tabac avec 26% de la cohorte concernée par un tabagisme actif et 20% avec un tabagisme sevré.

L'exposition au cannabis ou les infections au VIH, VHB ou VHC n'étaient pas représentées de façon majoritaire dans la population étudiée.

N	50
Âge moyen (années)	33
IMC moyen (kg/m ²)	25,2
Type d'infertilité n (%)	
• Primaire	34 (68%)
• Secondaire	16 (32%)
Tabagisme n (%)	
• Actif	13 (28%)
• Sevré	10 (22%)
• Nul	23 (50%)
Consommation d'alcool n (%)	
• Actif	11 (26%)
• Sevré	0 (0%)
• Nul	32 (74%)
Cannabis n (%)	
• Actif	1 (2%)
• Sevré	1 (2%)
• Nul	43 (96%)

Risque viral n (%)	
• VIH	0 (0%)
• VHB	3 (7%)
• VHC	0 (0%)
• Nul	42 (93%)

Tableau 5 : Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée

PARAMÈTRES SPERMATIQUES

Concernant les résultats des paramètres spermatiques, vingt-deux patients (44%) avaient un sperme qualifié de normal tandis que vingt-huit patients (58%) avaient un sperme anormal avec au moins une anomalie mise en évidence (oligo, asthéo, térato ou nécrozoospermie).

Concernant les résultats de DFI et SDI nous avons obtenus des résultats pour 13 patients de la cohorte. Parmi eux, deux présentaient une hausse de SDI et aucun ne présentaient un résultat augmenté de DFI.

Concernant les résultats de la spermoculture, cinq patients (5/41 ; 12%) avaient une spermoculture positive. Le germe le plus fréquemment retrouvé était *Mycoplasma hominis* (dans 40% des cas).

Paramètres spermatiques	Effectif N (%)
Sperme normal	22 (44%)
Asthénozoospermie	12 (24%)
Tératozoospermie	23 (46%)
Oligozoospermie	7 (14%)
Oligo-asthéo-tératozoospermie	5 (10%)
Anomalie DFI	0 (0%)
Anomalie SDI	2 (15%)

Tableau 6 : Paramètres spermatiques de la population étudiée

PARAMETRES DES TENTATIVES DE FIV

Sur les cinquante patients étudiés, dix-sept d'entre eux ont bénéficié d'une tentative d'AMP au sein de notre centre, dix en ICSI (59%) et sept en FIV classique (41%).

Le taux de fécondation moyen était de 64% et le taux de polyspermie retrouvé était de 2%.

Le taux moyen de clivage était de 80% avec un taux moyen d'obtention de blastocystes de 51%.

Le taux moyen de blastocystes qualifiés « d'utiles » c'est à dire de qualité suffisante pour pouvoir être transférés était de 24%.

La majorité des blocages lors du développement embryonnaire ont eu lieu à un stade précoce (41% des cas) avant le stade de morula.

	Moyenne ± SD
Technique d'AMP utilisée <ul style="list-style-type: none">• FIV classique• FIV – ICSI	7/17 (41%) 10/17 (59%)
Nombre d'ovocytes matures	12±6,8
Taux de fécondation (%)	64±28,4
Taux de polyspermie (%)	2±5,1
Taux de clivage (%)	80±30,8
Taux de blastulation (%)	51±34,2
Taux de blastulation utile (%)	24±28,5
Blocage précoce avant le stade morula (%)	41±30,7
Blocage tardif à partir du stade morula (%)	24±21,1

Tableau 7 : Résultats des tentatives d'AMP obtenues pour la population étudiée

II/ DOSAGE DE LA PLC ζ

Sur le plan de la mise en place du dosage, nous avons pu obtenir des résultats pour nos 50 patients étant donné qu'aucun patient n'a été exclu au cours de l'analyse.

Pour les patients avec une concentration spermatique très faible, si le volume de l'éjaculat était limitant dans le calcul du volume à prélever au départ, nous prenions l'échantillon entier pour débiter la technique. Pour ces patients nous avons mis en évidence un temps d'acquisition légèrement plus long au cytomètre.

Dans un premier temps nous avons procédé au fenêtrage des spermatozoïdes (P1) en les sélectionnant sur leur taille et leur granularité. Nous avons ensuite réalisé un overlay qui a permis de déterminer le seuil de positivité de la PLC ζ dans l'échantillon.

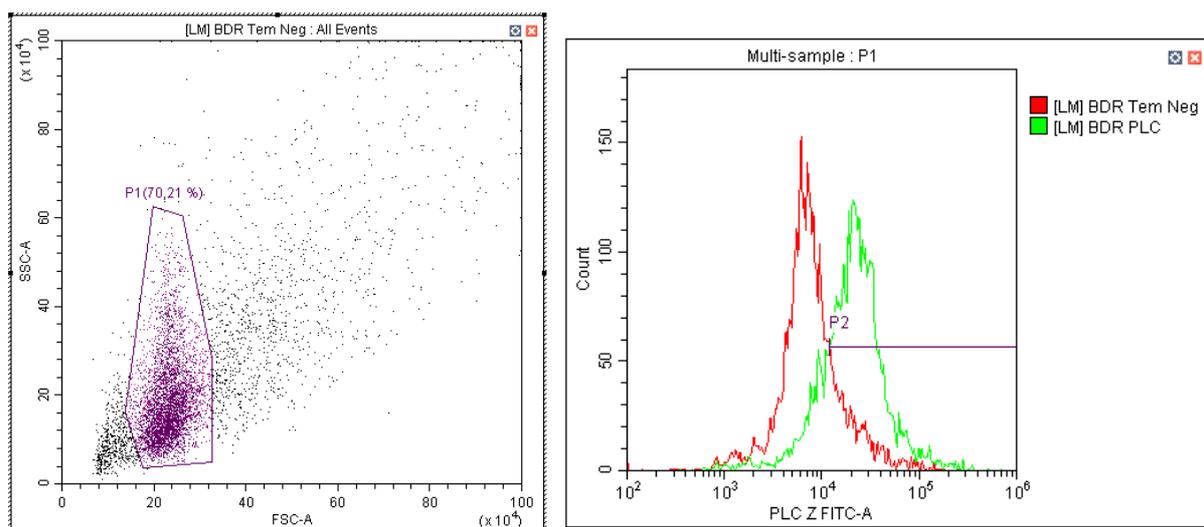


Figure 12 : Fenêtrage des spermatozoïdes (à gauche) et réalisation d'un overlay (à droite) du tube contrôle négatif (en rouge) et de l'échantillon patient (en vert)

Ce seuil obtenu a été ensuite reporté sur les pics de fluorescence du contrôle négatif et de l'échantillon Px pour interpréter le pourcentage de cellules marquées et donc exprimant la PLC ζ . Le pourcentage exprimé par le contrôle négatif (autofluorescence ou accrochage non spécifique) est ensuite déduit du pourcentage exprimé par l'échantillon patient.

De plus, nous avons mesuré la MFI qui correspond à la fluorescence moyenne par cellule. De la même manière, celle du contrôle négatif a été déduite de la MFI du patient pour obtenir l'intensité d'expression de la PLC ζ par spermatozoïde chez le patient.

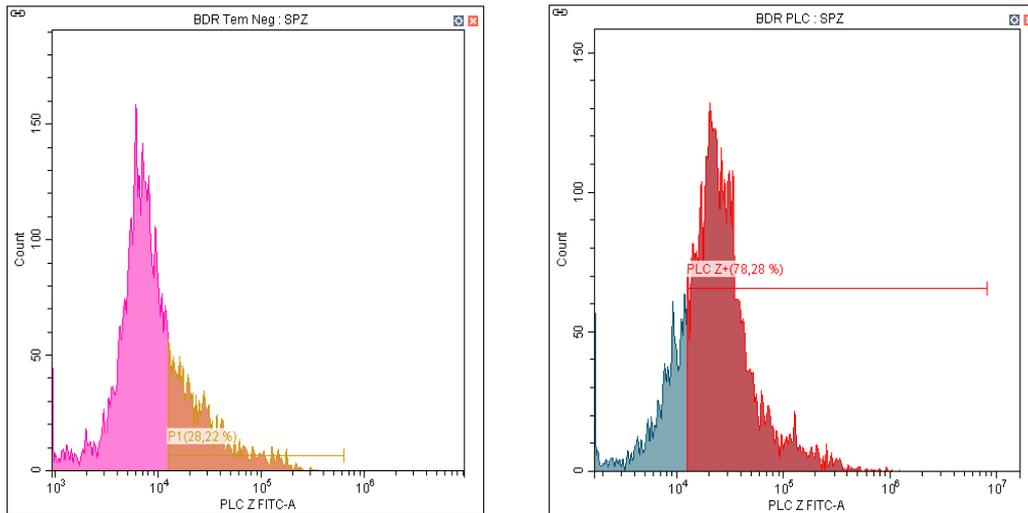


Figure 13 : Obtention du pourcentage de cellules exprimant la PLC ζ et de la MFI pour le contrôle négatif (à gauche) puis pour le patient (à droite)

Comme indiqué précédemment nous avons retranché l'auto-fluorescence (qui correspond au contrôle négatif patient) au tube échantillon patient correspondant. Les résultats que nous avons obtenus sont présentés dans le Tableau 8.

	Moyenne \pm SD	Minimum	Maximum
% PLC ζ contrôles négatifs	33 \pm 14,7	10	66
% PLC ζ tubes échantillons	79 \pm 8,3	56	91
% spermatozoïdes exprimant la PLCζ	45\pm15,9	9	69
MFI contrôles négatifs	37 909 \pm 37 837	8 187	253 028
MFI tubes échantillons	83 166 \pm 95 840	21 410	674 726
MFI finale	45 257\pm62 337	- 32 215	421 698

Tableau 8 : Résultats des spermatozoïdes exprimant la PLC ζ et des MFI obtenues pour la cohorte de patients étudiée

III/ IMPACT DE LA PLCζ SUR LES PARAMETRES SPERMATIQUES STANDARDS

COMPARAISON DU TAUX DE PLCζ CHEZ LES POPULATIONS A SPERME NORMAL ET ANORMAL

Dans un premier temps nous avons souhaité comparer le pourcentage de PLCζ et la MFI exprimés par les spermatozoïdes des patients avec spermes normaux et ceux avec au moins une anomalie des paramètres spermatiques en utilisant le test de Student.

	<u>Groupe 1</u> :	<u>Groupe 2</u> :	p
	Spermogramme normal N = 22	Spermogramme anormal N = 28	
	Moyenne ± SD		
% de spermatozoïdes exprimant la PLCζ	51,7±12,9	40,5±16,6	0,010*
MFI	42006±33883	50294±76755	0,611

Tableau 9 : Test de Student comparant le pourcentage de spermatozoïdes exprimant la PLCζ et la MFI entre les patients avec spermogramme normal et les patients avec anomalie du spermogramme (* significativité ; p<0,05)

Nous avons mis en évidence une différence quant au pourcentage de spermatozoïdes exprimant la PLCζ, qui est significativement plus élevée dans le groupe à sperme normal versus le groupe à sperme anormal.

CORRELATION ENTRE LA PLCζ ET LES PARAMETRES SPERMATIQUES STANDARDS

Dans un premier temps nous avons cherché à observer s'il existait une corrélation entre le pourcentage de spermatozoïdes exprimant la PLCζ et les différents paramètres spermatiques.

	r	p
pH	-0,09	0,542
Volume (mL)	-0,09	0,504
Concentration spermatique (M/mL)	0,34	0,016*
Numération spermatique (M/éjaculat)	0,15	0,297
Mobilité spermatique (a+b) (%)	0,33	0,019*
Vitalité spermatique (%)	0,14	0,351
Quantité de cellules rondes (M/mL)	-0,16	0,274
Formes typiques (%)	0,21	0,140

Tableau 10 : Etude de corrélation entre le % de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ et les paramètres spermatiques (* significativité ; $p < 0,05$; r = coefficient de corrélation)

Nous avons observé une corrélation positive, significative ($p < 0,05$) avec la concentration et la mobilité progressive spermatiques.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé les mêmes analyses de corrélation mais cette fois avec les données de MFI obtenues :

	r	p
pH	0,26	0,067
Volume (mL)	0,01	0,929
Concentration spermatique (M/mL)	0,15	0,269
Numération spermatique (M/éjaculat)	0,08	0,541
Mobilité spermatique (a+b) (%)	0,26	0,062
Vitalité spermatique (%)	0,01	0,991
Quantité de cellules rondes (M/mL)	0,08	0,577

Formes typiques (%)	-0,01	0,945
---------------------	-------	-------

Tableau 11 : Etude de corrélation entre la MFI et les paramètres spermatiques
(* significativité ; $p < 0,05$; r = coefficient de corrélation)

Nous ne mettons en évidence aucune corrélation significative entre la valeur de MFI et les paramètres spermatiques.

III/ IMPACT DE LA PLC ζ SUR LES PARAMETRES DE TENTATIVES EN FIV

Nous avons regardé si nous mettons en évidence une corrélation entre le pourcentage de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ et les résultats obtenus lors des tentatives de FIV réalisées.

	r	p
Nombre d'ovocytes matures	0,09	0,709
Taux de fécondation (%)	-0,32	0,205
Taux de polyspermie (%)	-0,59	0,012*
Taux de clivage (%)	-0,16	0,531
Taux de blastulation (%)	0,50	0,039*
Taux de blastulation utile (%)	0,42	0,089
Blocage précoce avant le stade morula (%)	-0,17	0,491
Blocage tardif à partir du stade morula (%)	-0,39	0,113
MFI	0,30	0,031*

Tableau 12 : Etude de corrélation entre le % de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ et les résultats de la FIV (* significativité ; $p < 0,05$; r = coefficient de corrélation)

Nous avons observé une corrélation positive, significative avec le taux de blastulation et le taux de MFI et une corrélation négative avec le taux de polyspermie.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé les mêmes analyses de corrélation mais cette fois avec les données de MFI obtenues :

	r	p
Nombre d'ovocytes matures	-0,26	0,311
Taux de fécondation (%)	-0,36	0,151
Taux de polyspermie (%)	-0,39	0,122
Taux de clivage (%)	-0,26	0,304
Taux de blastulation (%)	0,35	0,165
Taux de blastulation utile (%)	0,05	0,843
Blocage précoce avant le stade morula (%)	0,11	0,667
Blocage tardif à partir du stade morula (%)	-0,48	0,052
% de spermatozoïdes exprimant la PLCζ	0,30	0,031*

Tableau 13 : Etude de corrélation entre la MFI et les résultats de la FIV

(* significativité ; $p < 0,05$; r = coefficient de corrélation)

Nous ne mettons en évidence aucune corrélation significative entre la valeur de MFI et les paramètres spermatiques ou les résultats de la FIV.

La seule corrélation significative retrouvée est entre le pourcentage de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ et la valeur de MFI, corrélation déjà mise en évidence précédemment sur le Tableau 12.

DISCUSSION

I/ REVUE DE LA LITTÉRATURE

Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont démontré le rôle essentiel de la PLC ζ dans l'activation ovocytaire et dans l'infertilité masculine. Elle est considérée comme ayant un rôle déterminant en cas d'échecs partiels ou totaux de fécondation et devient donc la cible de traitements novateurs de l'infertilité d'origine masculine.

La mise en évidence et la quantification de la PLC ζ par le biais de l'immunofluorescence indirecte est aujourd'hui la technique de référence. Elle a pour avantages d'évaluer la localisation de la PLC ζ en plus de permettre sa quantification. En effet, elle est importante, puisque dans de nombreuses études, la localisation de la PLC ζ au sein du spermatozoïde a un fort impact sur les résultats de fécondation et sur la qualité spermatique²⁶. En effet, l'une d'elle met en évidence qu'une localisation acrosomiale ou équatoriale de la PLC ζ est associée à un meilleur taux de fécondation qu'une localisation plus dispersée au sein du spermatozoïde²⁷.

Cependant elle présente comme faiblesse de ne pas évaluer une grande proportion de spermatozoïdes, que l'on compte souvent par milliers dans un éjaculat.

L'utilisation de la cytométrie en flux permet en effet une analyse d'un plus grand nombre de spermatozoïdes et ainsi une quantification plus précise. De plus, cette quantification est aussi plus reproductible et moins sujette à une interprétation opérateur-dépendant. Elle permet, d'obtenir un résultat, même dans le cas d'une oligozoospermie.

Néanmoins, la cytométrie de flux ne permet pas de déterminer la localisation de la PLC ζ au sein du spermatozoïde.

Après revue de la littérature, aucun cut-off de PLC ζ n'a encore été établi. De plus, une étude a mis en évidence une variation importante du taux de PLC ζ entre hommes fertiles et infertiles mais aussi au sein de différents éjaculats d'un même patient²⁸. Dans cette même étude, il est mis en évidence une MFI calculée par champ microscopique autour de 60 unités arbitraires pour les patients fertiles et autour de 25 unités pour les patients infertiles. Concernant la proportion moyenne de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ : 82,6% chez les patients fertiles et 27,4% pour les infertiles.

Dans notre population, la moyenne de 45% paraît acceptable avec un minimum de taux à 9% et un maximum à 69%.

Concernant nos objectifs secondaires, nous avons mis en évidence une corrélation positive, significative entre le pourcentage de cellules exprimant la PLC ζ et la concentration et la mobilité spermatisques, résultats conformes à ce qui est retrouvé dans la littérature^{28,29}.

De plus, nous mettons en évidence la présence d'un pourcentage de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ plus haut chez les patients à sperme normal que chez les patients à sperme anormal, ce qui est en accord avec la littérature et plusieurs études qui mettent en évidence un taux de PLC ζ plus faible chez les patients infertiles que les patients fertiles.

Cependant certaines études ne mettent pas en évidence de lien entre baisse du taux de PLC ζ et altérations des paramètres spermatisques, sous-entendant que certains hommes aux paramètres spermatisques normaux pourraient avoir des taux de PLC ζ abaissés, ce qui pourrait expliquer en partie les échecs de fécondation en FIV avec des paramètres spermatisques normaux³⁰.

D'après les résultats que nous avons obtenus, il apparaît plus judicieux de s'intéresser au pourcentage de cellules exprimant la PLC ζ qu'à la valeur de la MFI obtenue. Malheureusement peu d'études utilisent un dosage de PLC ζ par cytométrie en flux et nous avons peu de données dans la littérature faisant intervenir la MFI obtenue par cytométrie.

Dans une étude de Kashir et al²⁷ précédemment citée, les meilleurs taux de fécondation lors de tentative d'ICSI ont été obtenus chez des patients qui avaient les plus hauts taux de PLC ζ en association avec une localisation acrosomale et équatoriale de celle-ci par rapport aux contrôles. De plus, une étude conduite sur des hommes asthénozoospermiques a mis en évidence une absence de corrélation entre le taux de PLC ζ et l'âge masculin, en revanche elle met en évidence une corrélation entre l'âge masculin et la localisation de la PLC ζ au sein du spermatozoïde. Ceci suggère que le vieillissement aurait un impact non pas sur le taux mais sur la localisation de la PLC ζ , contribuant ainsi à une baisse de la fertilité chez les hommes plus âgés³¹.

L'étude de Aras-Tosun et al³² a étudié la MFI et le taux de PLC ζ de 43 échantillons de sperme en cytométrie de flux puis a confirmé les résultats en immunofluorescence indirecte. Deux groupes distincts ont été fait : le groupe avec 40% ou moins de taux de fécondation et le groupe avec 60% ou plus. Leur analyse n'a pas mis en évidence de différence significative entre ces deux groupes et la MFI (groupe taux bas ($20.6 \times 10^4 \pm 32.2 \times 10^4$) et groupe taux haut ($12.2 \times 10^4 \pm 22.3 \times 10^4$; $p = .282$)) ou le taux de PLC ζ (groupe taux bas ($44.2 \pm 20.1\%$) et groupe taux haut ($34.1 \pm 22.3\%$) ($p = .152$)). Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le taux de grossesse et la quantité de PLC ζ .

Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence une corrélation positive significative entre le taux de PLC ζ et le taux de blastulation ainsi qu'une corrélation négative significative avec le taux de polyspermie. Ceci paraît être en accord avec le fonctionnement intrinsèque de la PLC ζ . Nous ne mettons toutefois pas en évidence de corrélation avec le taux de fécondation ou de clivage précoce contrairement à ce qui pourrait être attendu du mode d'action de la PLC ζ . Cependant ces données n'ont pas été analysées précisément dans la littérature.

Toutes ces données mettent en avant la complexité de la dynamique de la PLC ζ en lien avec les taux de fécondation et sur la qualité spermatique globale. En effet, certaines études évoquent la possibilité d'autres acteurs dans l'activation ovocytaire, ce qui pourrait expliquer l'absence de corrélation mise en évidence dans notre étude entre taux de PLC ζ et taux de fécondation.

La PAWP (post-acrosomal sheath Tryptophan-Tryptophan domain binding protein) serait l'une de celles-ci. Elle a été mise en évidence par Wu et al ³³. C'est une protéine localisée exclusivement dans la zone post-acrosomique du spermatozoïde ³⁴. Le rôle de cette protéine est cependant débattu dans la littérature puisque Nomikos et al en 2014 a injecté une PAWP recombinante chez des souris et ceci n'a pas permis de déclencher les oscillations calciques dans l'ovocyte ³⁵. Tandis que Aarabi et al ³⁶ ont mis en évidence une hausse des niveaux calciques intracellulaires et une formation des pronucléus après injection d'une PAWP recombinante dans des ovocytes de *Xenopus laevis* (espèce d'amphibiens). Ils ont ensuite testé cette technique sur des ovocytes de souris et d'humain et ont obtenus le même résultat. ³⁷ Son rôle précis dans la fécondation humaine reste donc encore à établir et elle n'est pas responsable à elle seule de l'activation ovocytaire.

II/ LIMITES DE L'ETUDE

Une des limites de notre étude est le faible effectif de patients recrutés ainsi que la faible proportion de ceux-ci ayant eu une tentative de FIV en cours au sein de notre centre. D'avantage de patients seraient nécessaires pour permettre d'augmenter la puissance de nos résultats.

De plus, la mise en place de ce dosage requiert un début de technique du prélèvement le jour du recueil pour les étapes de fixation et de perméabilisation. Cela impose une contrainte technique importante mais nécessaire puisque la congélation de l'échantillon est connue pour abaisser le taux de PLC ζ en altérant la membrane spermatique ³⁸. Les patients doivent donc être convoqués le jour de l'analyse.

Le temps total de la technique est aussi conséquent, 4 heures et 30 minutes au total pour une série de patient (temps techniques + temps d'incubations + temps d'acquisition et rendu du résultat) et serait à organiser par rapport au temps de travail des techniciens du service.

III/ PERSPECTIVES

Concernant la mise en place de ce dosage il est envisageable de le mettre en place en routine diagnostique pour nos patients faisant face à des échecs de fécondation, des fécondations anormales ou des blocages précoces de développement embryonnaire en FIV.

Des essais supplémentaires doivent être réalisés pour évaluer la faisabilité de conserver les échantillons fixés et perméabilisés au frais pour plus de 24h dans un souci de flexibilité de réalisation du dosage. En cas de mise en place finale du dosage, une validation de méthode sera à réaliser pour répondre aux exigences du COFRAC (Comité Français d'Accréditation).

En cas d'échecs de fécondation partiel ou totaux d'origine spermatique ou de polyspermie lors d'une tentative de FIV, nous pourrions ainsi proposer aux patients ce dosage et si le taux de PLC ζ retrouvé paraît bas, nous pourrions les orienter vers une recherche de mutations de la protéine.

Pour ces patients, la meilleure option thérapeutique à l'heure actuelle reste l'AOA. Elle consiste à réaliser une supplémentation calcique lors de l'ICSI. Cette technique fait l'objet de nombreuses études dans la littérature avec des résultats plutôt satisfaisants avec l'obtention de meilleurs taux de fécondation, de blastocystes utiles et par la suite de grossesses évolutives^{39, 40, 41} ; mais cette pratique reste pour le moment encore non réglementée en France.

Elle fait également débat quant aux effets tératogènes, cytotoxiques et épigénétiques à long terme sur la descendance car leur évaluation n'est pas encore possible, faute de recul suffisant⁴²⁻⁴⁴.

Une autre option thérapeutique faisant l'objet de recherche est l'utilisation d'une PLC ζ recombinante. Une étude parue très récemment a étudié cette utilisation sur des ovocytes de souris dans un premier temps pour mettre en évidence la génération des oscillations calciques, puis dans un second temps, ils ont utilisé des œufs de poules fécondés qu'ils ont divisés en trois groupes : un groupe sans substance injectée, un groupe avec injection de 200 μ L de PBS et un groupe avec injection d'1 μ g de PLC ζ recombinante⁴⁵. Ces œufs ont été examinés du jour de l'injection à environ 7 jours de culture. La viabilité du développement embryonnaire des œufs

exposés à la PLC ζ recombinante n'a pas été compromise par rapport aux autres groupes ce qui est un argument en faveur d'une relative sécurité quant à l'utilisation de celle-ci. Cependant, d'autres études complémentaires sur le sujet sont nécessaires pour étoffer le développement et évaluer les effets à long termes de cette thérapeutique novatrice.

Dans l'optique de mettre en place ce dosage en routine, l'algorithme de prise en charge ci-dessous qui pourrait être proposé dans le service :

* : normes à rediscuter

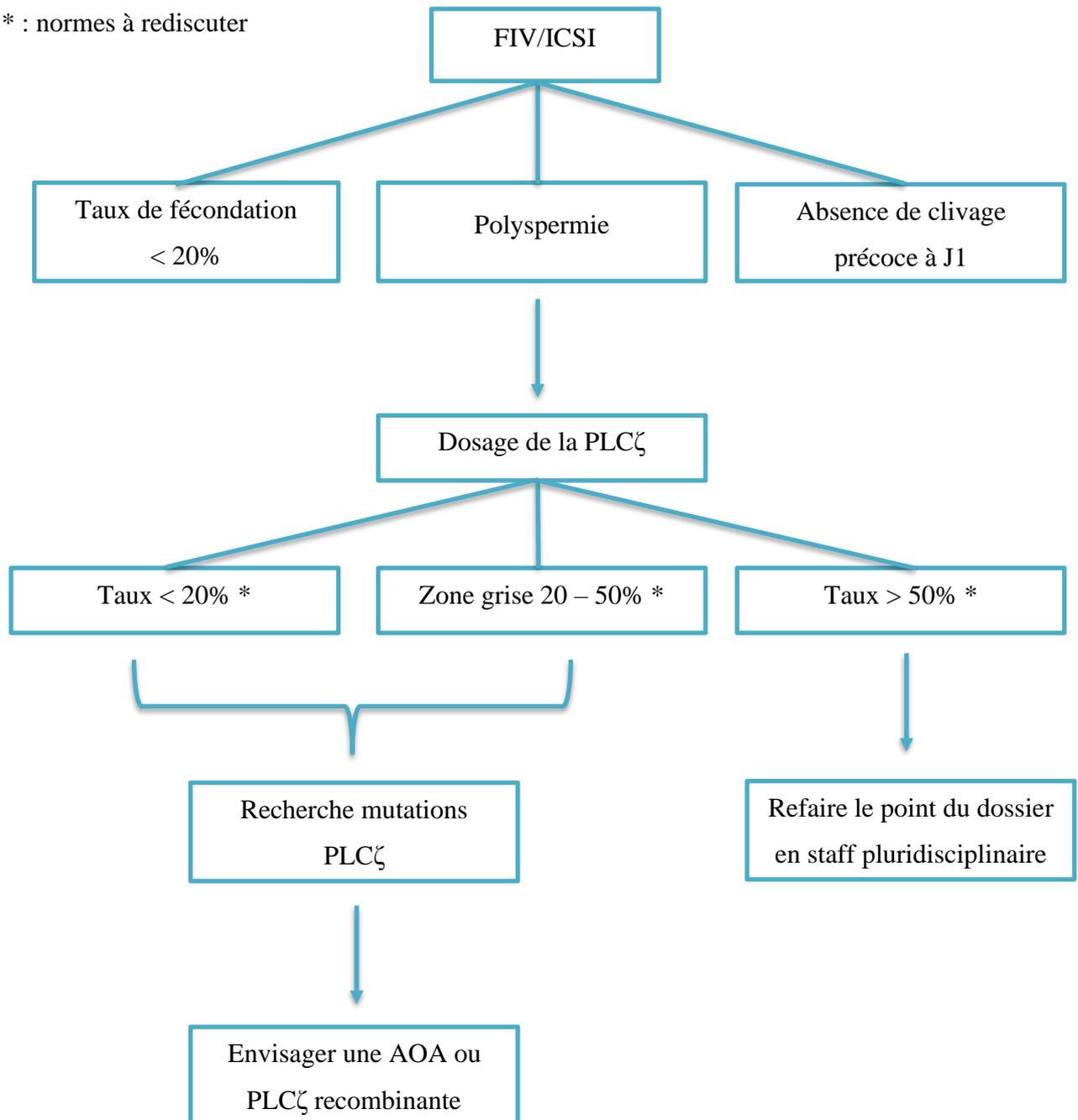


Figure 14 : Algorithme proposé pour prendre en charge les patients faisant face à un échec de fécondation, une polyspermie ou un blocage précoce lors d'une tentative de FIV en AMP

CONCLUSION

La mise en place du dosage de la PLC ζ par cytométrie en flux au CHU Amiens Picardie nous permettra de mettre à disposition des patients faisant face à un échec partiel ou total de fécondation une analyse complémentaire, plus poussée, sur l'analyse de leur compétence spermatique. Nous avons pu obtenir des résultats analysables pour tous les patients étudiés en mettant en évidence une corrélation positive entre le taux de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ et la concentration et la mobilité spermatiques. Ce taux est également corrélé de manière significative à un meilleur taux de blastulation et un taux plus faible de polyspermie lors d'une tentative de FIV et donc à une meilleure qualité de la tentative. La poursuite de cette mise en place de dosage passera par la réalisation d'une validation de méthode afin de pouvoir proposer cette analyse aux patients faisant face à des échecs partiels ou totaux de fécondation lors d'une tentative de FIV au sein de notre centre.

ANNEXES

Annexe 1 – Questionnaire DFI-SDI

	Questionnaire à un patient venant pour FRAG / SDI Pôle Femme Couple Enfant LBM-BDR
---	--

Etiquette patient :

Profession :

Poids :

Exposition à la chaleur : oui non

→ Exposition directe à une source de chaleur

→ Position assise prolongée

→ Sport intense

Exposition professionnelle à des produits toxiques : oui non

Si oui, lesquels :

Habitat en milieu rural : oui non

Proximité de cultures : oui non

→ Pendant la grossesse de la mère

→ De l'enfance à l'adolescence

→ Pendant l'âge adulte

Fumeur :

→ Tabac oui non sevré

→ Cannabis oui non sevré

→ Cigarette électronique oui non sevré

Si oui, nombre de cigarettes, de joints ou de vapotage /jour :

Durée d'exposition (même sevré) :

Tabagisme passif dans l'enfance : oui non

Mère tabagique pendant la grossesse : oui non

Prise d'autres toxiques : oui non

Si oui, lesquels :

Antécédents de fausses couches avec conjointe : oui non

Traitement antioxydant : oui non

Si oui, lequel :

Durée du traitement :

Document associé à « Indice de dénaturation de l'ADN spermatique (SDI) » [CHU-FAN0147](#)

« Fragmentation de l'ADN spermatique » [CHU-FAN0146](#)

Annexe 2 – Normes du spermogramme selon l’OMS (2021)

		Unité
Volume	1,4	<i>mL</i>
Concentration	16	<i>Millions/mL</i>
Numération dans l’éjaculat	39	<i>Millions/éjaculat</i>
Mobilité totale (a+b+c)	42	%
Mobilité progressive (a+b)	30	%
Vitalité	54	%
Formes typiques	4 (selon Krüger)	%

Annexe 3 – Liste des matériels et réactifs utilisés

- PBS (Werfen, Barcelone, Espagne)
- Formaldéhyde 37% (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- Citrate de sodium en poudre 1% (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- Bovin serum albumin (BSA) en poudre (VWR international SAS, Fontenay-sous-Bois, France)
- Cytomètre de flux DXFLEX® (Beckman Coulter, Pasadena, Californie USA)

Annexe 4 – Dilution de l'anticorps primaire

Nombre de tubes	Ac 1aire (µL)	avec 10%	PBS (µL)	avec 10%
1	0,25	0,275	49,75	54,725
2	0,5	0,55	99,5	109,45
3	0,75	0,825	149,25	164,175
4	1	1,1	199	218,9
5	1,25	1,375	248,75	273,625
6	1,5	1,65	298,5	328,35
7	1,75	1,925	348,25	383,075
8	2	2,2	796	875,6
9	2,25	2,475	447,75	492,525
10	2,5	2,75	497,5	547,25

Annexe 5 – Dilution de l'anticorps secondaire

Nombre de tubes	Ac 2aire FITC (µL)	avec 10%	PBS (µL)	avec 10%
1	1	1,1	199	218,9
2	2	2,2	398	437,8
3	3	3,3	597	656,7
4	4	4,4	796	875,6
5	5	5,5	995	1094,5
6	6	6,6	1194	1313,4
7	7	7,7	1393	1532,3
8	8	8,8	1592	1751,2
9	9	9,9	1791	1970,1
10	10	11	1990	2189

BIBLIOGRAPHIE

1. INSERM. <https://www.inserm.fr/dossier/infertilite/> (2019).
2. Hamamah, S. Vers une stratégie nationale de lutte contre l'infertilité. in *Infertilité* 439–444 (Elsevier, 2023). doi:10.1016/B978-2-294-78134-6.00049-8.
3. Slama, R. *et al.* Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis. *Hum. Reprod.* **27**, 1489–1498 (2012).
4. De La Rochebrochard, É. 1 enfant sur 30 conçu par assistance médicale à la procréation en France: *Popul. Sociétés* N° **556**, 1–4 (2018).
5. Ministère de la santé et de la prévention. *Guide Bonnes Pratiques*. (2023).
6. Sonigo, C. *et al.* Prise en charge de première intention du couple infertile : mise à jour des RPC 2010 du CNGOF. *Gynécologie Obstétrique Fertil. Sénologie* **52**, 305–335 (2024).
7. Harris, J. D. *et al.* Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: The ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq.* **4**, 361–393 (1994).
8. Tang, L. Predictive value of the sperm DNA fragmentation index for low or failed IVF fertilization in men with mild-to-moderate asthenozoospermia. (2020).
9. Mahutte, N. G. & Arici, A. Failed fertilization: is it predictable? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **15**, 211 (2003).
10. Combelles, C. M. H. Diagnosing cellular defects in an unexplained case of total fertilization failure. *Oxford University Press* (2010).
11. Kinzer, D. R., Barrett, C. B. & Powers, R. D. Prognosis for clinical pregnancy and delivery after total fertilization failure during conventional in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* **90**, 284–288 (2008).
12. Peultier, A.-S., Fréour, T., Cazenave, N. & Barrière, P. Les échecs de fécondation en FIV et en ICSI. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* **44**, 380–386 (2015).
13. Saunders, C. M. *et al.* PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca $^{2+}$ oscillations in eggs and embryo development. *Development* **129**, 3533–3544 (2002).
14. Heytens, E. *et al.* Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC ζ) in spermatozoa from infertile men. *Hum. Reprod.* **24**, 2417–2428 (2009).
15. Yoon, S.-Y. *et al.* Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca $^{2+}$ release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J. Clin. Invest.* **118**, 3671–3681 (2008).
16. Nomikos, M. *et al.* Phospholipase C ζ binding to PtdIns(4,5) P $_2$ requires the XY-linker region. *J. Cell Sci.* **124**, 2582–2590 (2011).
17. Thanassoulas, A., Swann, K., Lai, F. A. & Nomikos, M. SPERM FACTORS AND EGG ACTIVATION: The structure and function relationship of sperm PLCZ1. *Reproduction* **164**, F1–F8 (2022).
18. Nomikos, M. *et al.* Phospholipase C ζ rescues failed oocyte activation in a prototype of male factor infertility. *Fertil. Steril.* **99**, 76–85 (2013).
19. Hachem, A. *et al.* PLC ζ is the physiological trigger of the Ca $^{2+}$ oscillations that induce embryogenesis in mammals but conception can occur in its absence. *Development* **144**, 2914–2924 (2017).
20. Nozawa, K., Satouh, Y., Fujimoto, T., Oji, A. & Ikawa, M. Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice. *Sci. Rep.* **8**, 1315 (2018).
21. Swann, K. Sperm-Induced Ca $^{2+}$ Release in Mammalian Eggs: The Roles of PLC ζ , InsP $_3$, and ATP. *Cells* **12**, 2809 (2023).

22. Saleh, A. *et al.* Essential Role of Sperm-Specific PLC-Zeta in Egg Activation and Male Factor Infertility: An Update. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 28 (2020).
23. Peng, Y. *et al.* Mutations in PLCZ1 induce male infertility associated with polyspermy and fertilization failure. *J. Assist. Reprod. Genet.* **40**, 53–64 (2023).
24. Lin, Y. *et al.* Novel mutations in PLCZ1 lead to early embryonic arrest as a male factor. *Front. Cell Dev. Biol.* **11**, 1193248 (2023).
25. Tong, K.-Y. *et al.* Novel PLCZ1 mutation caused polyspermy during in vitro fertilization. *Asian J. Androl.* **26**, 389–395 (2024).
26. Yeste, M. *et al.* Does advancing male age influence the expression levels and localisation patterns of phospholipase C zeta (PLC ζ) in human sperm? *Sci. Rep.* **6**, 27543 (2016).
27. Kashir, J. *et al.* Phospholipase C zeta profiles are indicative of optimal sperm parameters and fertilisation success in patients undergoing fertility treatment. *Andrology* **8**, 1143–1159 (2020).
28. Kashir, J. *et al.* Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability. *Fertil. Steril.* **99**, 107-117.e3 (2013).
29. Yelumalai, S. *et al.* Total levels, localization patterns, and proportions of sperm exhibiting phospholipase C zeta are significantly correlated with fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* **104**, 561-568.e4 (2015).
30. Lee, H. C. *et al.* Protein phospholipase C Zeta1 expression in patients with failed ICSI but with normal sperm parameters. *J. Assist. Reprod. Genet.* **31**, 749–756 (2014).
31. Rahimizadeh, P. *et al.* The alteration of PLC ζ protein expression in unexplained infertile and asthenoteratozoospermic patients: A potential effect on sperm fertilization ability. *Mol. Reprod. Dev.* **87**, 115–123 (2020).
32. Aras-Tosun, D. *et al.* Phospholipase C-zeta levels are not correlated with fertilisation rates in infertile couples. *Andrologia* **54**, (2022).
33. Wu, H., He, C. L. & Fissore, R. A. Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine eggs. *Mol. Reprod. Dev.* **46**, 176–189 (1997).
34. Nakai, M. *et al.* Phospholipase C ζ (PLC ζ) versus postacrosomal sheath WW domain-binding protein (PAWP): Which molecule will survive as a sperm factor? *Anim. Sci. J.* **91**, e13345 (2020).
35. Nomikos, M. *et al.* Sperm-specific post-acrosomal WW-domain binding protein (PAWP) does not cause Ca $^{2+}$ release in mouse oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* **20**, 938–947 (2014).
36. Aarabi, M., Qin, Z., Xu, W., Mewburn, J. & Oko, R. Sperm-borne protein, PAWP, initiates zygotic development in *Xenopus laevis* by eliciting intracellular calcium release. *Mol. Reprod. Dev.* **77**, 249–256 (2010).
37. Aarabi, M. *et al.* Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice. *FASEB J.* **28**, 4434–4440 (2014).
38. Moreau, J., Fargeon, S., Gatimel, N., Parinaud, J. & Léandri, R. D. Expression of phospholipase PLC Zeta in human spermatozoa: impact of cryopreservation. *Andrology* **7**, 315–318 (2019).
39. Chithiwala, Z. H. *et al.* Phospholipase C-zeta deficiency as a cause for repetitive oocyte fertilization failure during ovarian stimulation for in vitro fertilization with ICSI: a case report. *J. Assist. Reprod. Genet.* **32**, 1415–1419 (2015).
40. Nazarian, H. *et al.* Effect of Artificial Oocyte Activation on Intra-Cytoplasmic Sperm Injection Outcomes in Patients with Lower Percentage of Sperm Containing Phospholipase C ζ : A Randomized Clinical Trial. **20**, (2019).
41. Shan, Y. *et al.* Assisted Oocyte Activation With Calcium Ionophore Improves Pregnancy Outcomes and Offspring Safety in Infertile Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Physiol.* **12**, 751905 (2022).

42. Chen, C. *et al.* Ionomycin-induced mouse oocyte activation can disrupt preimplantation embryo development through increased reactive oxygen species reaction and DNA damage. *Mol. Hum. Reprod.* **26**, 773–783 (2020).
43. Abdulsamad, H. M. R. *et al.* The Therapeutic and Diagnostic Potential of Phospholipase C Zeta, Oocyte Activation, and Calcium in Treating Human Infertility. *Pharmaceuticals* **16**, 441 (2023).
44. Anifandis, G. *et al.* Artificial oocyte activation: physiological, pathophysiological and ethical aspects. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **65**, 3–11 (2019).
45. Saleh, A. *et al.* Development of Recombinant PLC-Zeta Protein as a Therapeutic Intervention for the Clinical Treatment of Oocyte Activation Failure. *Biomedicines* **12**, 1183 (2024).

Mise en place du dosage de la phospholipase c zêta comme biomarqueur de compétence spermatique

RÉSUMÉ

La fécondation dans l'espèce humaine est un processus de plus en plus connu. Le rôle central de la PLC ζ dans le processus d'activation ovocytaire est bien établi et sa quantification fait l'objet de nombreuses recherches.

Cette étude prospective et longitudinale menée au sein du centre d'AMP du CHU Amiens-Picardie s'est déroulée entre mars et août 2024, en étroite collaboration avec le laboratoire d'Immunologie. Elle avait pour objectif la mise en place du protocole de dosage de la PLC ζ par cytométrie de flux et a permis d'obtenir des résultats pour 50 patients (22 avec un sperme normal, 28 avec un sperme anormal).

Dans un premier temps nous avons comparé les taux moyens de PLC ζ entre le groupe de patients à sperme normal et le groupe à sperme anormal. Nous avons mis en évidence un taux moyen plus élevé chez les patients à sperme normal. Concernant le taux de PLC ζ et les paramètres spermatiques, nous avons mis en évidence une corrélation positive avec la concentration et la mobilité spermatiques. Concernant les résultats de la FIV, nous avons mis en évidence une corrélation positive entre le taux de PLC ζ et le taux de blastulation et une corrélation négative entre le taux de PLC ζ et le taux de polyspermie.

Nos résultats sont prometteurs quant au protocole mis en place, cependant une cohorte plus importante serait nécessaire pour permettre d'établir une valeur seuil de PLC ζ . Une validation de méthode serait également nécessaire pour une mise en place en routine.

Mots-clés : infertilité masculine, phospholipase C zêta, PLC ζ , sperme, FIV, fécondation.

Establishment of Phospholipase C Zeta assay as a biomarker of sperm competence

ABSTRACT

Fertilization in humans is an increasingly well-understood process. The central role of PLC ζ in oocyte activation is well established, and its quantification is the subject of numerous studies. This prospective and longitudinal study, conducted at the ART center of CHU Amiens-Picardie between March and August 2024, was carried out in close collaboration with the Immunology Laboratory. Its objective was to establish a protocol for measuring PLC ζ using flow cytometry, and it yielded results for 50 patients (22 with normal sperm and 28 with abnormal sperm).

First, we compared the average PLC ζ levels between the group of patients with normal sperm and those with abnormal sperm. We observed a higher average level in patients with normal sperm. Regarding PLC ζ levels and sperm parameters, we found a positive correlation with sperm concentration and motility. Regarding IVF outcomes, we found a positive correlation between PLC ζ levels and blastocyst formation rate and a negative correlation between PLC ζ levels and polyspermy rate.

Our results are promising for the established protocol, but a larger cohort would be needed to establish a threshold value for PLC ζ . Method validation would also be necessary for routine implementation.

Key words : male infertility, phospholipase C zeta, PLC ζ , sperm, IVF, fertilization.