

Intérêt du dosage de l'élastase dans le liquide séminal pour le diagnostic de l'inflammation et de l'infection du tractus urogénital masculin

Amel Zhioua¹, Selima Fourati¹, Hanene Elloumi¹, Ghaya Merdassi¹, Anis Chaker², Fethi Zhioua², Jean Claude Soufir³

¹Université Tunis El Manar, Faculté de Médecine de Tunis, Hôpital Aziza Othmana, Laboratoire de Biologie de la Reproduction, La Kasba, Tunis, Tunisie ; ²Université Tunis El Manar, Faculté de Médecine de Tunis, Hôpital Aziza Othmana, Service de Gynécologie Obstétrique, La Kasba, Tunis, Tunisie ; ³Université Paris-Sud XI, Faculté de Médecine, Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Biologie Andrologique, Hôpital Kremlin-Bicêtre, 94270, Paris, France

A. Zhioua, S. Fourati, H. Elloumi, G. Merdassi, A. Chaker, F. Zhioua, J. C. Soufir

A. Zhioua, S. Fourati, H. Elloumi, G. Merdassi, A. Chaker, F. Zhioua, J. C. Soufir

Intérêt du dosage de l'élastase dans le liquide séminal pour le diagnostic de l'inflammation et de l'infection du tractus urogénital masculin

The usefulness of elastase measurement in the sperm for the diagnosis of urogenital male inflammation and infection

LA TUNISIE MEDICALE - 2013 ; Vol 91 (n°04) : 269-272

LA TUNISIE MEDICALE - 2013 ; Vol 91 (n°04) : 269-272

R É S U M É

Prérequis : L'inflammation des voies génitales masculines est une cause fréquente d'infertilité chez l'homme pouvant être cliniquement silencieuse, se traduisant exclusivement par une leucospermie >10⁶/ml. Durant l'inflammation, les leucocytes activés libèrent des protéases lysosomiales dont l'élastase, identifiée dans le sperme et associée à son inhibiteur pour former le complexe élastase-inhibiteur.

But : Evaluer le dosage du complexe élastase-inhibiteur séminal comme méthode de diagnostic de l'inflammation des voies génitales masculines en le comparant à la leucospermie, méthode de référence préconisée par l'OMS.

Méthodes : Cette étude a intéressé 83 hommes infertiles adressés pour analyse du sperme. La leucospermie et le dosage du complexe élastase-inhibiteur ont été réalisés sur le liquide séminal.

Résultats : Le dosage de l'élastase révèle 38% de sujets positifs. La concordance avec la leucospermie est bonne (79%) avec un coefficient de concordance Kappa=0.78. La sensibilité de l'élastase est de 100%, la spécificité est de 75% avec une VPP de 47% et une VPN de 100%. L'indice de Youden est de 0.75. Dans le groupe avec leucospermie >1 million/ml, tous les patients présentaient une élastase >250ng/ml dont 73% un taux supérieur à 1000ng/ml. Dans le groupe des patients sans leucospermie, 75% ont des taux d'élastase <250ng/ml, 21% des taux compris entre 250 et 1000ng/ml et 4% (soit 3 patients) des taux >1000ng/ml. Ces patients à élastase élevée sans leucospermie avaient soit une infection génitale avec spermoculture positive soit des partenaires ayant une stérilité tubaire.

Conclusion : Le dosage séminal de l'élastase est un marqueur plus sensible que la leucospermie dans le diagnostic de l'infection-inflammation urogénitale masculine.

S U M M A R Y

Background: Genital tract inflammation is a frequent cause of infertility among men, usually clinically silent with only leukocytospermia defined as the presence of white blood cells (WBC) >1.10⁶/ml in semen. During the inflammation process, granulocytes discharge large amounts of proteases such as elastase. The elastase linked to its inhibitor in the form of a complex the elastase α 1-protease inhibitor in semen is suggested as a potential marker of genital tract inflammation.

Aim: To assess the measurement of elastase as a biomarker of genital tract inflammation by comparing this technique with the detection of leukocytospermia according to the WHO guidelines.

Methods: This study interested 83 infertile men attending the andrology center for semen analysis. Leukocytospermia was assessed by a peroxidase test and elastase concentration by immunoassay in the seminal plasma.

Results: An elevated elastase was found in 38% of men. A similarity was found between leukocytospermia and elastase in 79% of cases, kappa coefficient concordance with leukocytospermia is good (0.78). The sensitivity of the elastase is 100%, the specificity= 75%. The positive predictive value is 47%, the negative predictive value is 100% with a Youden index=0.75. All patients with leukocytospermia >1.10⁶/ml had an elastase >250ng/ml, 73% of them a concentration >1000 ng/ml. In the group of patients with no leukocytospermia, 75% had elastase <250ng/ml, 21% had concentration between 250 and 1000ng/ml and 4% (3 patients) a concentration >1000ng/ml.

Conclusion: Seminal elastase is a more sensitive marker than leukocytospermia in the diagnosis of male urogenital inflammation and infection.

Mots-clés

Elastase, inflammation, voies génitales masculines, leucospermie, infertilité

Key-words

Elastase, inflammation, male genital tract, leukocytospermia, infertility.

L'inflammation des voies génitales masculines est une cause fréquente d'infertilité chez l'homme. Elle peut être cliniquement latente se traduisant uniquement par une leucospermie définie suivant les critères de l'OMS par une concentration de globules blancs dans le sperme supérieure à 106/ml [1]. La fréquence des leucospermies chez l'homme infertile est de 10 à 20% [2]. L'inflammation du tractus génital peut avoir plusieurs origines. Elle peut être secondaire à une infection, à un traumatisme, à la prise d'alcool, de tabac ou de drogues. Nous nous limiterons ici à l'inflammation secondaire à l'infection (les autres causes étant rares) et le terme inflammation-infection sera utilisé. L'inflammation peut entraîner des altérations tant de l'appareil génital que du sperme et même d'éventuels échecs en fécondation naturelle et in vitro [3]. Durant le processus inflammatoire, l'altération tissulaire provoque la libération de cytokines (TNF α), d'interleukines (IL6 et 8), de prostaglandines, de leucotriènes et de médiateurs secondaires de l'inflammation.

Ces derniers entraînent une activation des polynucléaires neutrophiles (PolyMorphoNucléaires : PMN) et des macrophages qui libèrent des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) et de grandes quantités de protéases lysosomiales telles que la cathepsine G, la collagénase et l'élastase. L'élastase va entraîner une fragmentation de l'ADN conduisant à une mort cellulaire et à la destruction du tissu. L'action de l'élastase est régulée par la présence de son inhibiteur : l' α 1-protéase inhibiteur (α 1-PI) [4]. Au début du processus inflammatoire, l'élastase libérée par les granulocytes est principalement sous forme libre puis elle est rapidement inactivée par l' α 1-PI [4]. Plusieurs auteurs suggèrent que le dosage de ce complexe élastase-inhibiteur constitue un marqueur sensible et quantitatif de l'infection et/ou de l'inflammation du tractus génital masculin [5-8].

Le but de cette étude est d'évaluer l'intérêt du dosage du complexe élastase-inhibiteur dans le diagnostic de l'infection-inflammation des voies génitales masculines en le comparant au dosage de la leucospermie, méthode de référence préconisée par l'OMS [1].

MATERIEL ET METHODES

L'étude a porté sur 83 hommes infertiles adressés au laboratoire d'andrologie de l'Hôpital Kremlin-Bicêtre pour analyse biochimique du sperme. Le sperme est recueilli par masturbation après 3 à 5 jours d'abstinence sexuelle. Les spermogrammes ont été réalisés au laboratoire de biologie de la reproduction de l'Hôpital Jean Verdier, selon les recommandations de l'OMS [1]. Le leucoscreen ou recherche de la leucospermie par la méthode à la peroxydase et le dosage de l'élastase ont été réalisés lorsque la concentration en cellules rondes dans le sperme était ≥ 2 millions/ml.

Recherche de leucospermie : Elle a été réalisée par un test à la peroxydase (Leucoscreen ; JCD, La Mulatière, France) conformément aux recommandations de l'OMS [1]. Ce test est basé sur une visualisation cytochimique de l'activité peroxydasique granulocytaire. Les produits utilisés sont

présentés en un kit contenant 2 réactifs :

-Le réactif 1 contient du méthanol, de la phloxine B et de l'aminobenzidine.

-Le réactif 2 contient de l'eau oxygénée.

La solution de travail est préparée en ajoutant 30 μ l du réactif 2 à 1ml du réactif 1. Dix microlitres de sperme sont ensuite mélangés avec 10 μ l de la solution de travail. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, on peut compter au microscope optique à l'objectif 40, le nombre de cellules peroxydase positives présentant une coloration rouge-brun. Ces cellules correspondent aux polynucléaires neutrophiles, tandis que les autres cellules peroxydase négatives sont colorées en rose. On peut établir le pourcentage des polynucléaires neutrophiles par rapport à l'ensemble des cellules rondes dans le sperme. La concentration en polynucléaires neutrophiles par millilitre est calculée en multipliant leur pourcentage par la concentration en cellules rondes. Une concentration supérieure à 1million/ml indique une inflammation du tractus génital masculin [1].

Dosage de l'élastase :

Après une période de liquéfaction de 30 minutes à 37°C, le prélèvement de sperme est centrifugé (3000 t/mn pendant 15mn) et le liquide séminal recueilli est congelé à -20°C jusqu'au jour du dosage. La concentration en PMN élastase est déterminée grâce à une technique immunoenzymatique qui permet un dosage spécifique de l'élastase des leucocytes polymorphonucléaires complexés avec la PMN élastase α 1 protéinase inhibiteur (Immunoassay PMN Elastase, Merck, Clevenot). Tous les échantillons de liquide séminal ont été décongelés le même jour et dilués au 1/10ème conformément aux recommandations du fournisseur. Chacun de ces échantillons dilués est déposé dans un puits d'une plaque de microtitrage à 96 puits et incubés pendant une heure. La paroi de ces puits est recouverte d'anticorps spécifiques de l'élastase. Puis, on ajoute l'anticorps secondaire marqué à la phosphatase alcaline et on réincube pendant une heure. Des lavages successifs, permettent d'éliminer les anticorps excédentaires marqués à la phosphatase alcaline. La révélation est obtenue après incubation avec le 4 nitrophényl-phosphate. La réaction est stoppée par une solution de NaOH 2 fois normale. La densité optique est mesurée par un spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 405nm. (Safas UV mc²). On détermine la concentration de l'élastase en multipliant la valeur retrouvée sur la courbe de calibration par le facteur de dilution utilisé (*10). Les résultats sont exprimés en nanogramme (ng) d'élastase/ml. Une concentration supérieure à 250ng/ml est considérée comme pathologique conformément aux données de la littérature [8-10]. Par ailleurs un taux d'élastase compris entre 250 et 1000ng/ml indique une inflammation modérée du tractus génital masculin et un taux >1000 ng/ml indique une inflammation sévère. Ces seuils ont également été choisis conformément à ceux préconisés par la plupart des auteurs [8,12].

Méthodologie statistique : Afin d'évaluer le dosage du complexe élastase-inhibiteur comme marqueur de l'inflammation des voies génitales masculines, nous avons calculé la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive

(VPP), la valeur prédictive négative (VPN), l'indice de Youden et le test de Kappa. La sensibilité est la fréquence des tests positifs chez les malades. La spécificité est la fréquence des tests négatifs chez les sujets sains. La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité d'avoir la maladie quand le test est positif. La valeur prédictive négative (VPN) est la probabilité de ne pas avoir la maladie quand le test est négatif.

L'indice de Youden = sensibilité+spécificité-1. Les valeurs de ce test varient de -1 à 1. Un test diagnostique est d'autant plus informatif que l'indice de Youden est proche de 1 et n'a aucune valeur informative si le test est proche de 0 ou de -1.

Le coefficient de Kappa ou coefficient de concordance permet de mesurer la reproductibilité d'un test. Il s'agit d'un coefficient mesurant l'accord entre deux jugements qualitatifs en tenant compte de la part de concordance due au hasard. Son interprétation se fait en fonction du tableau 2.

Tableau 1 : Comparaison entre le dosage de l'élastase spermatique et la leucospermie

	Leucospermie négative (n=68)	Leucospermie ≥10 ⁶ /ml (n=15)	
Elastase<250ng/ml	51	0	51
Elastase≥250ng/ml	17	15	32
	68	15	83

Tableau 2 : Grille d'interprétation du Kappa

Accord	Kappa
Très bon	> 0.81
Bon	0.61-0.80
Moyen	0.41-0.60
Médiocre	0.21-0.40
Mauvais	0.0 -0.20
Exécutable	< 0

RESULTATS

Quatre vingt trois patients infertiles ont été inclus dans cette étude. Six patients présentent une azoospermie (7%), 9 (10%) une athénospermie, 9 (10%) une oligospermie, 42 (50%) une oligoasthénospermie et 17 (20%) sont normozoospermiques. L'âge moyen était de 33±4.68 ans avec des extrêmes allant de 24 à 49 ans. Les résultats sont rapportés dans le tableau de contingence 1. Pour le dosage de l'élastase, nous avons trouvé 38% de sujets positifs et 62% de sujets négatifs. La concordance avec la leucospermie est de 79% avec un coefficient de concordance Kappa=0.78 soit une bonne concordance (Tableau 2). La sensibilité de l'élastase est de 100%, la spécificité est de 75% avec une VPP de 47% et une VPN de 100%. Enfin, l'indice de Youden est de 0.75. Dans le groupe présentant une leucospermie>1 million/ml, tous les patients présentaient un taux d'élastase>250ng/ml et 73% avaient un taux d'élastase supérieur à 1000ng/ml (Tableau 3). Dans le groupe des patients ne présentant pas de leucospermie, 75% ont des taux d'élastase < 250ng/ml, 21% des taux compris

entre 250 et 1000ng/ml et 4% (soit 3 patients) ont un taux d'élastase>1000ng/ml.

Tableau 3 : Patients ayant une concentration d'élastase séminale < 250 µg/L (absence d'inflammation), comprise entre 250 et 1000 µg/L (inflammation modérée) et > 1000 µg/L (inflammation sévère) en fonction de la présence ou non de leucospermie

	Leucospermie négative (n=68)	Leucospermie ≥10 ⁶ /ml (n=15)	
Elastase<250ng/ml (absence d'inflammation)	51	0	51
250ng/ml<Elastase<1000ng/ml (Inflammation modérée)	14	4	18
Elastase>1000ng/ml (Inflammation sévère)	3	11	14
	68	15	83

DISCUSSION

A travers cette étude, nous voulions évaluer l'apport du dosage de l'élastase séminale dans le diagnostic de l'infection-inflammation du tractus uro-génital masculin. Pour cela, nous avons choisi de comparer cette méthode à la détermination de la leucospermie par le test à la peroxydase. Ce choix se justifie par le fait que la leucospermie est une méthode standardisée et préconisée par l'OMS [1].

Nos résultats montrent que le dosage de l'élastase comme marqueur de l'inflammation des voies génitales masculines présente une bonne sensibilité (100%) et une bonne spécificité (75%) pour une valeur seuil de 250ng/ml. Nos résultats concordent avec ceux de la littérature. En effet, Zorn B et al proposent un seuil de 290ng/ml pour pouvoir identifier une inflammation définie par une leucospermie>1million/ml avec une sensibilité de 79.5% et une spécificité de 74.4% [5]. Ce seuil est proche du seuil de 250ng/ml proposé par Jochum M et al [9], Mičić S et al [10], Yoshida et al [11] et choisi dans notre étude. L'indice de Youden de 0,75 est considéré comme bon. En effet, la valeur diagnostique d'un test est d'autant plus grande que l'indice de Youden est proche de 1. Le coefficient de concordance Kappa est de 0,78. D'après le tableau II, ce coefficient est considéré comme bon permettant de conclure qu'il existe une bonne concordance entre la leucospermie et le dosage de l'élastase et ce d'autant plus que tous les patients ayant une leucospermie>1million/ml ont des taux d'élastase>250ng/ml.

En l'absence de leucospermie, on note la présence d'un taux d'élastase élevé chez 25% des patients. La réaction à la peroxydase met en évidence les leucocytes par la coloration de leurs granulations. La peroxydase ne met donc pas en évidence les leucocytes activés qui sont dégranulés. Ceci est le principal inconvénient de cette méthode, pourtant simple et peu onéreuse. Ainsi, la présence d'un taux d'élastase élevé chez les patients n'ayant pas de leucospermie pourrait témoigner de la présence de leucocytes dégranulés non colorés par le leucoscreen. Nous pouvons donc nous demander s'il existe plutôt une corrélation entre la concentration de l'élastase et celle des cellules rondes dans le liquide séminal puisque ce groupe de patients sans leucospermie présente tout de même une concentration de

cellules rondes > 2 millions/ml. Parmi eux, 21% (soit 14 patients) ont des taux compris entre 250 et 1000 ng/ml témoin d'une inflammation modérée des voies urogénitales, et 4% (soit 3 patients) ont un taux d'élastase > 1000 ng/ml, témoin d'une inflammation sévère. Là aussi nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature puisque Zorn B et al [13] retrouvent des concentrations élevées d'élastase chez 25% des hommes sans leucospermie. Ainsi, Zorn B estime que l'élastase est un marqueur plus fiable que la leucospermie pour le diagnostic des infections-inflammations uro-génitales masculines [13]. D'autres auteurs [14] placent même l'élastase en première ligne dans le diagnostic des inflammations et des infections du tractus génital au vu de sa sensibilité et de sa spécificité. Afin de pouvoir trouver une explication aux taux d'élastase élevés chez les patients ne présentant pas de leucospermie, nous avons cherché si un argument clinique d'infection-inflammation pouvait être trouvé dans leurs dossiers.

Pour les trois patients ayant des taux d'élastase > 1000 ng/ml, l'un d'eux avait des antécédents de prostatite chronique objectivée par des marqueurs prostatiques diminués, le second présentait une spermoculture positive à 104 UFC/ml d'*Ureaplasma Urealyticum*. Pour le 3ème patient, aucun argument clinique en faveur d'une infection/inflammation n'a été retrouvé mais l'interrogatoire nous apprend que sa femme a subi une salpingectomie bilatérale suite à une infection à *Chlamydiae Trachomatis*. Parmi les 14 patients ayant des taux d'élastase compris entre 250 et 1000 ng/ml, 6 avaient des spermocultures positives (2 patients à *Staphylococcus aureus*, 1 à *Enterococcus faecalis*, 2 à *Escherichia Coli* et 1 à *Corynebacterium seminale*). Pour les 8 autres patients, nous n'avons trouvé aucun élément dans leurs dossiers en faveur

d'une infection-inflammation car ils étaient au début de leurs explorations.

CONCLUSION

L'inflammation du tractus génital mâle est fréquente et délétère pour la fonction de la reproduction. Malheureusement, elle reste négligée et insuffisamment explorée surtout après l'avènement de l'injection intra cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) qui a occulté l'un des volets essentiels du diagnostic de l'infertilité masculine à savoir : l'exploration biochimique du sperme, au profit d'une attitude pragmatique et non scientifique : la recherche du spermatozoïde à micro-injecter. Pourtant, la littérature et la pratique nous apprennent que les spermatozoïdes qui se retrouvent dans cet environnement inflammatoire pourraient avoir une fragmentation de l'ADN élevée par le biais du stress oxydatif et aboutir à des échecs de fécondation ou d'implantation même si ces patients sont inclus dans un programme d'ICSI. Pour diagnostiquer ces infections-inflammations urogénitales masculines, la clinique et la leucospermie sont bien souvent insuffisantes et de plus, d'une interprétation complexe. En y associant le dosage de l'élastase, certaines infections génitales asymptomatiques peuvent être diagnostiquées et ainsi prises en charge à temps. L'association antibiotique et anti-inflammatoire non stéroïdiens reste le traitement de choix. Un dosage régulier de l'élastase permettrait de suivre l'évolution sous traitement. Depuis quelques années, plusieurs auteurs recommandent d'ajouter à l'association AINS/antibiotiques des anti-oxydants oraux pendant une durée minimale de 3 mois afin d'améliorer le bien-être (degré d'apoptose) des spermatozoïdes [15].

Références

- World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th ed. New York : Cambridge University Press, 1999.
- Wolff H. Methods for detection of male genital tract inflammation. *Andrologia*. 1998 ;30 (suppl 1) :35-9.
- Comhaire F, Mahmoud AMA, Depuydt CE, et coll. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential : the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update* 1999 ; 5 : 393-8.
- Fritz H., Jochum M., Geiger R., Duswald KH., Dittmer H., Kortmann H., Neumann S., Lang H. Granulocyte proteinases as mediators of unspecific proteolysis in inflammation: a review. *Folia. Histochem. Cytobiol*. 1986; 24: 99-115.
- Zorn B, Virant-Klun I, Meden-Vrtovec H. Semen granulocyte elastase : its relevance for the diagnosis and prognosis of silent genital tract inflammation. *Hum Reprod* 2000 ;15:1978-84.
- Zorn B, Marqueurs biochimiques du sperme à la recherche de l'inflammation génitale : intérêt de la détermination de l'élastase. *Gynécol Obstet Fertil* 2005 ; 33:678-83.
- Zorn B. Le sperme inflammatoire : Ses relations avec la fertilité. *Andrologie* 2009 ;19: 39-44.
- Zorn B, Ihan A, Kopitar AN et coll. Changes in sperm apoptotic markers as related to seminal leukocytes and elastase. *RBMonline* 2010 ;21:84-92.
- Jochum M, Pabst W, Schill WB. Granulocyte elastase as a sensitive diagnostic parameter of silent male genital tract inflammation. *Andrologia* 1986, 18:413-9.
- Mičić S., Macura M., Lalić N., Dotlić R. Elastase as an indicator of silent genital tract infection in infertile men. *Int. J. Androl*. 1989; 12: 423-9.
- Yoshida K., Kobayashi N., Negishi T. Chlamydia trachomatis inflammation in the semen of asymptomatic infertile men: detection of the antigen by in situ hybridization. *Urol. Int*. 1994; 53: 217-21.
- Wolff H., Anderson DJ. Evaluation of granulocyte elastase as a seminal plasma marker for leukocytospermia. *Fertil. Steril*. 1988; 50: 129-32.
- Zorn B., Sešek-Briški A., Osredkar J., Meden-Vrtovec H. Semen PMN elastase as a diagnostic and prognostic marker of genital tract inflammation - a review. *Clin. Chem. Lab. Med*. 2003; 41: 2-12.
- Behre HM., Nieschlag E., Meschede D. Diseases of the seminal ducts. In: Nieschlag E and Behre HM, editors. *Andrology: Male reproductive health and dysfunction*. 2nd ed., Springer, 2000: 177-89.
- Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, El Toukhy T. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility/ *RBM Online*. 2010; 20:711-23.