

Le microbiome testiculaire des hommes azoospermiques : première preuve de l'impact d'une altération du microenvironnement

Étant donné l'importance du microenvironnement extracellulaire, dont le microbiome¹ est une composante, une équipe italienne milanaise a envisagé qu'un lien pourrait exister entre le microbiome bactérien testiculaire et l'aplasie des cellules germinales dans l'azoospermie non obstruc-

¹ Le microbiote désigne l'ensemble des micro-organismes qui prédominent ou sont durablement adaptés à la surface et à l'intérieur d'un organisme vivant, hors état pathologique : archées (unicellulaires procaryotes, dépourvus de noyau, de 0,1 à 15 µm), protistes (unicellulaires eucaryotes n'appartenant à aucune des autres catégories), fungi ou champignons (eucaryotes), bactéries commensales (unicellulaires procaryotes de quelques microns), voire virus... Le microbiome désigne maintenant l'ensemble des génomes du microbiote, qui peut être analysé par un séquençage collectif (métagénomique [1]). Le microbiome bactérien, anciennement appelé « flore microbienne », est la composante bactérienne du microbiote. Le mycobiome sont les champignons du microbiome. L'estimation de la biodiversité des bactéries a bénéficié, il y a une vingtaine d'années, de l'extraordinaire évolution des méthodes d'analyse moléculaire, qui a permis l'étude du contenu génétique d'un échantillon analysé par séquençage direct de l'ADN présent dans l'échantillon sans passer par une étape de culture (métagénomique). Ainsi, l'analyse de la séquence ADN d'un gène particulier, celui codant l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S), présent chez tous les procaryotes mais avec des petites variations d'une espèce à l'autre, permet d'évaluer l'étendue de la biodiversité bactérienne et de constater que le nombre d'espèces présentes dans les milieux naturels dépasse largement le nombre de celles que l'on peut cultiver. Ces techniques sont à la base de l'évaluation actuelle des microbiomes.

tive idiopathique (ANOI), qui représente 80 % des azoospermies non obstructives chez l'homme. Chez la souris, des expériences de transplantation de cellules souches germinales mâles ont prouvé l'importance de l'effet de « niche », qui permet à des cellules souches spermatogoniales d'animaux infertiles [2] ou âgés [3] de réaliser une spermatogenèse normale après transfert dans le microenvironnement testiculaire de souris fertiles ou jeunes.

Le microbiome bactérien (MB) intestinal, l'un des plus étudiés chez l'humain, est capable d'agir localement et à distance sur un certain nombre de processus physiologiques, tels que la maturation du système immunitaire ou celle de l'épithélium intestinal, mais également sur la régulation des taux circulants de testostérone [4],

² C'est en décembre 2007 qu'est lancé aux États-Unis un vaste projet scientifique dénommé Human Microbiome Project. Il vise à séquencer tous les gènes (quelque 3 millions) et génomes des micro-organismes vivant normalement chez l'homme, à partir d'échantillons prélevés dans la bouche, la gorge et le nez, sur la peau, dans le tube digestif, et dans le tractus urogénital, principalement féminin. Des projets similaires sont développés en Europe : Metagenomics of the Human Intestinal Tract (Meta HIT) et My New Gut. Le microbiome humain est spécifique de chaque individu, provenant en partie de la mère et en partie du père, influencé par l'alimentation et se modifiant avec le vieillissement. « Ce qui était souvent considéré comme la simple cohabitation d'un organisme supérieur avec des micro-organismes commensaux se trouve être une véritable association à bénéfices réciproques avec échanges multiples de signaux partenaires » [8].

d'œstrogènes [5] et du complexe vitaminique B [6], tous trois impliqués dans la spermatogenèse. Les déséquilibres de ce MB intestinal, ou *dysbioses*, semblent pouvoir influencer la santé de l'hôte, et sont suspectés de favoriser l'apparition de diverses pathologies : diabète de type 2, obésité, maladies cardiovasculaires, allergies, maladies inflammatoires chroniques (Crohn, rectocolite hémorragique), cancer colorectal, etc.

Le microbiome de divers tissus et habitats humains a déjà été décrit² [7], mais aucune équipe ne s'était encore intéressée au tissu testiculaire, d'où l'intérêt de cette étude transversale, comparant le MB d'échantillons de pulpe testiculaire normale avec celui provenant d'hommes avec ANOI et recueil positif ou négatif de spermatozoïdes après micro-TESE (pour *microchirurgical testicular sperm extraction*).

Matériel et méthodes

Sujets

Les sujets, infertiles et azoospermiques – selon les critères 2010 de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) – ont été scindés en deux groupes selon que le recueil de spermatozoïdes, lors d'un micro-TESE [9, 10], avait été positif ou négatif. Parmi les critères d'inclusion : être européen-caucasien et âgé de moins de 46 ans, n'avoir eu aucune infection bactérienne ni aucune antibiothérapie au moment du prélèvement chirurgical ni dans les six mois précédant l'intervention. Parmi les critères d'exclusion : avoir une azoospermie non obstructive associée à un facteur connu d'infertilité, à une anomalie

génétique (quel qu'en soit le type), à des anomalies hypothalamohypophysaires ou à un antécédent de chirurgie testiculaire ou hypophysaire, d'obstruction congénitale ou acquise des voies excrétrices masculines, ou encore de tumeur testiculaire.

Les sujets témoins, normospermiques, devaient subir une orchidectomie unilatérale pour séminome non métastatique. Du tissu était prélevé sur le testicule atteint mais en zone saine, le plus à distance possible de la tumeur. Un recueil de sperme était demandé avant l'opération pour réaliser un spermogramme détaillé, vérifier sa normalité, exclure toute azoospermie et proposer une cryoconservation.

Chaque groupe comprenait cinq individus ayant un bilan biologique sanguin normal dans les trois mois précédant l'intervention et un bilan hormonal le matin de celle-ci pour dosage sérique des gonadotrophines, hormones folliculostimulante et lutéinisante (FSH et LH) et de la testostérone totale [9].

Les échantillons de tissu testiculaire des patients avec ANOI étaient

conservés dans une solution de congélation de diméthyl sulfoxyde (10 %) dans du sérum de veau fœtal (90 %) et ceux des témoins dans un mélange hydrosoluble de glycols et résines (OCT, pour *optimal cutting temperature compound*). L'analyse histologique des coupes, colorées à l'hématoxyline-éosine à partir du tissu fixé dans le formol et inclus dans la paraffine (FFPE, pour *formalin-fixed paraffin-embedded*), s'est faite selon le score de Johnsen³ [11].

Étude du microbiome bactérien testiculaire

L'évaluation quantitative du MB testiculaire est opérée en étudiant les séquences 16S du gène codant l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S). L'isolement de l'ADN du tissu testiculaire se fait en utilisant le kit QIAamp DNA FFPE (Qiagen) et toujours en parallèle à l'extraction de l'ADN de lignées cellulaires P3⁴ cultivées en présence d'antibiotiques, servant de contrôles négatifs, et à l'ADN de frottis buccaux, servant de contrôles positifs. L'analyse quantitative des séquences 16S de l'ADN total comprend une amplification à l'aide de sondes 16S panbactériennes (ThermoFisher) et d'une PCR (*polymerase chain reaction*) digitale en émulsion (ddPCR, pour *droplet digital PCR*). La ddPCR comprend un fractionnement de l'échantillon jusqu'à 20 000 gouttelettes ne contenant chacune au maximum qu'une molécule d'acide nucléique. Dans chaque gouttelette sont réalisées l'amplification de l'ADN cible puis la détection du nombre de gouttelettes contenant une copie de 16S fluorescente, comparées à celles qui n'en contiennent pas et leur quantification rapportée à l'ADN total (200 ng) (technologie BIORAD).

⁴ Issues d'une métastase osseuse d'un cancer prostatique hormono-indépendant.

L'analyse qualitative du MB testiculaire [12] comprend une première étape d'amplification de la région V3-V5 du gène ADNr 16S par PCR « nichée » (*nested PCR*)⁵. Cette technique utilise successivement deux paires d'amorces dont la seconde amplifie une séquence (dite amplicon) se trouvant au sein des produits de première PCR, ce qui limite le risque d'amplification de séquences inattendues (FastStart High Fidelity PCR System, Roche). Les séquences extraites (kit Qiagen) et purifiées sont soumises à une PCR par émulsion suivie d'un pyroséquençage massif des amplicons 16S identifiés par un code-barres (plateforme 454-GS Junior, Roche). Les séquences de haute qualité et de plus de 250 paires de base sont retenues pour les analyses taxonomiques en bio-informatique à l'aide du logiciel QIIME (Quantitative Insights Into Microbiological Ecology, version 1.9.0). Le profil du microbiome (métagénome) est ainsi étudié à différents niveaux (ou taxons) de la classification des espèces en identifiant les unités taxonomiques opérationnelles (OTU, pour *operational taxonomic unit*), ensemble des séquences présentant au moins 97 % d'identité entre elles, grâce à l'algorithme UCLUST. Un rang taxonomique leur est assi-

⁵ Protocole de la *nested PCR*. La première amplification est réalisée avec les amorces 16S-F8 AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG et 16S-R1093 GTT GCG CTC GTT GCG GGA CT, en respectant le programme de variation thermique suivant : 95 °C/3 min ; quinze cycles à 94 °C/30 min ; 55 °C/45 min ; 72 °C/1 min ; 72 °C/8 min et une conservation à 4 °C. La seconde amplification des régions 16S V3-5 est réalisée avec les amorces spécifiques, identifiées par code-barres suivants : ACT CCT ACG GGA GGC AGC et 16S-R920 CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT grâce à l'utilisation du FastStart High Fidelity PCR System et aux cycles de température suivants : 95 °C/3 min ; trente-cinq cycles à 95 °C/30 min ; 55 °C/45 min ; 72 °C/1 min ; 72 °C/8 min.

³ Classification de Johnsen [11] : 10 : spermatogenèse complète et tubes normaux ; 9 : présence de nombreux spermatozoïdes mais désorganisation de la spermatogenèse ; 8 : rares spermatozoïdes ; 7 : absence de spermatozoïdes mais présence de nombreuses spermatides ; 6 : rares spermatides ; 5 : absence de spermatozoïdes et de spermatides mais présence de nombreux spermatocytes ; 4 : rares spermatocytes ; 3 : présence de spermatogonies uniquement ; 2 : absence de cellules germinales (SCOS, pour *Sertoli cell only syndrome*) ; 1 : absence de cellules germinales et de cellules de Sertoli. Le score de Johnsen s'obtient en divisant le score total d'au moins 100 tubes analysés par le nombre de tubes. Il aura donc une valeur discutable en cas d'hétérogénéité tubulaire et, dans ce cas, peu de valeur pronostique quant à la capacité à recueillir des spermatozoïdes lors de la microdissection testiculaire.

gné, du phylum jusqu'au genre⁶, avec l'aide du classificateur RDP (pour *ribosomal database project*). L'identification d'une espèce donnée se fait grâce à BLAST (pour *basic local alignment search tool*) en comparant les séquences analysées à celles d'une banque de données (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Ces différents outils d'analyse des données sont intégrés dans le logiciel QIIME.

L'identification de *Peptoniphilus asaccharolyticus* a été réalisée en sélectionnant, dans la liste des séquences 16S rARN, celles correspondant au genre *Peptoniphilus*. Trente séquences sont alors comparées dans BLAST et 95 % d'entre elles identifiées comme étant *P. asaccharolyticus*.

L'analyse de la biodiversité (diversité de la communauté bactérienne au sein d'un même prélèvement) a été exprimée sur une courbe de raréfaction, en fonction du nombre d'OTU observés sur l'analyse d'un nombre croissant de séquences jusqu'à 1 200 séquences par échantillon.

L'analyse de la biodiversité (entre prélèvements) par regroupement de séquences identiques à 95 % (*clustering*) a utilisé la technique pondérée Unifrac de mesure de la distance phylogénétique entre les communautés bactériennes et les méthodes statistiques de regroupement de données et d'analyse des coordonnées principales.

Signalons enfin que les auteurs précisent à plusieurs reprises les précautions prises, lors de toutes les étapes du protocole, pour éviter tout risque de contamination exogène

6 Exemple de la hiérarchie de classification taxonomique des espèces : domaine : Procaryote ; rang (ou règne) Bactérie ; phylum (ou embranchement) : Firmicutes ; classe : *Clostridia* ; ordre : *Clostridiales* ; famille : *Tissierellaceae* ; genre : *Peptoniphilus* ; espèce : *Peptoniphilus asaccharolyticus* (qui est, par ailleurs, un cocci Gram+ anaérobie).

Résultats

Caractéristiques cliniques et histologiques

L'âge médian des sujets de l'étude est similaire dans les différents groupes (test bilatéral Mann-Whitney) : 38 ans (IQR⁷ : 37-39) pour ceux avec ANOI, contre 40 ans (38-42) pour les témoins avec séminome testiculaire. Il est de 38 ans si l'on compare les deux sous-groupes ANOI (avec recueil de spermatozoïdes positif ou négatif lors de la dilacération du tissu testiculaire). Il en va de même pour le taux de testostérone total : 3 ng/mL (2,3-4) *versus* 4 (2,7-5,2) entre groupe ANOI et groupe témoin et pour celui de LH : 5,4 mU/mL (4,2-7) *versus* 3,8 (3,2-6,7). Par contre, le taux de FSH est significativement plus élevé dans le groupe ANOI, sans différence, là encore, entre les deux sous-groupes, témoignant d'une insuffisance testiculaire primaire (17,2 mU/mL [15-20] *versus* 10,6 [7-12], $p < 0,01$).

La spermatogenèse est normale chez les témoins et altérée chez les sujets ANOI, comme en témoigne le score de Johnsen : 9 (8,5-10) *versus* 3 (2,5-8), $p < 0,003$. Cette fois, la différence est également très significative entre les deux sous-groupes ANOI (5 [4-8] *versus* 2 [2-2], $p < 0,007$). Les échantillons de parenchyme testiculaire des cinq patients à recueil de spermatozoïdes positif montrent un arrêt de maturation des cellules germinales mais aussi de rares foyers de spermatogenèse active et complète tandis que ceux des cinq patients à recueil négatif sont dépourvus de toute cellule germinale.

Microbiome testiculaire et « dysbiose » entre groupes

Charge bactérienne

On décèle chez les sujets témoins de petites quantités de bactéries, révélées par leur séquence ADN 16S, avec une médiane de 3,4 copies et un IQR de 1,7-7 copies par nanogramme d'ADN analysé, comparé au bruit de fond généré

⁷ IQR : interquartile range (écart interquartile)

par les lignées cellulaires P3 (0,6 ; 0,6-0,8). Cette quantité d'ADN 16S est significativement plus élevée chez les sujets ANOI (12,1 ; 5-15) que chez les témoins ($p = 0,02$), mais identique entre les deux sous-groupes ANOI.

Mesure de la biodiversité

La biodiversité du MB testiculaire a été estimée pour chaque groupe, et montre, dans le groupe témoin, une plus grande diversité ($p = 2 \times 10^{-5}$) et que dans le groupe ANOI, tandis que les deux sous-groupes ANOI sont identiques.

Au niveau du phylum, le MB des témoins est plus riche, contenant *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria* tandis que seules *Actinobacteria* et *Firmicutes* sont présentes chez les sujets ANOI ($p < 0,05$). Il en va de même au niveau de la classe avec présence chez les témoins d'*Actinobacteria*, de *Bacilli*, de *Clostridia* et de *Proteobacteria alpha, beta et gamma*, tandis que seules *Actinobacteria*, *Bacilli* et *Clostridia* sont observées chez les sujets ANOI.

Cette fois, on observe, entre les deux sous-groupes ANOI, des différences significatives. Tandis que chez les sujets avec recueil de spermatozoïdes positif, la représentation des phyla *Actinobacteria* et *Firmicutes* est équivalente, chez les patients en aplasie germinale avec recueil de spermatozoïdes négatif, c'est *Actinobacteria* qui domine. Au niveau de la classe, *Actinobacteria* est surreprésentée mais on note une réduction drastique de *Clostridia*, ce que l'on retrouve aux différents niveaux taxonomiques et jusqu'à l'espèce, où *Peptoniphilus asaccharolyticus* a disparu.

Discussion et conclusion

Ces résultats montrent, pour la première fois, que le tissu testiculaire humain n'est pas microbiologiquement stérile, sans que, soulignent les auteurs, on puisse invoquer une éventuelle contribution des

communautés bactériennes présentes dans les tissus d'aval et/ou les autres organes du tractus urogénital. Ces résultats montrent également des différences significatives dans le microbiome des sujets infertiles avec ANOI, comparé à celui de témoins normospermiques. La charge bactérienne est plus élevée et il existe une moindre richesse taxonomique, qui s'accroît encore lorsque l'atteinte est sévère, chez les sujets avec recueil de spermatozoïdes négatif après TESE et aplasie germinale à l'histologie. On observe alors une domination du phylum *Actinobacteria* et une absence de la classe *Clostridia*. Or, dans des études du MB du sperme humain, deux genres de la classe *Clostridia* ont été associés à une moindre qualité spermatique (*Anaerococcus* [13]) ou à une augmentation des anomalies morphologiques (*Petroniphilus* [14]). La caractérisation de *Clostridia* dans le sperme pourrait-elle constituer en pratique un marqueur prédictif d'aplasie germinale ? La question mérite certainement d'être explorée, même si l'extrapolation est hasardeuse entre ces deux environnements : le sperme et le parenchyme testiculaire.

Les quatre phyla observés chez les sujets témoins prédominent également dans l'intestin humain avec des différences de représentation qui s'accroissent lors du vieillissement où l'on observe une réduction de la biodiversité et de la représentation de *Firmicutes* [15]. Ces anomalies sont similaires à celles observées dans le microbiome testiculaire des patients ANOI. Les

auteurs rappellent qu'il existe également au niveau de l'histologie testiculaire, des similitudes entre les altérations de l'épithélium séminifère observées chez des sujets âgés (hétérogénéité entre les tubes et les individus allant de l'atteinte modérée à l'aplasie germinale) [16] et ce qu'ils observent dans les deux sous-groupes de sujets ANOI, ce qui leur fait soulever l'hypothèse d'un mécanisme de vieillissement précoce à l'œuvre chez ces jeunes hommes infertiles sans cause étiologique connue.

Il existe certes des réserves et des limitations à ce travail, comme le soulignent les auteurs eux-mêmes : le nombre de sujets impliqués dans chaque groupe est faible (n = 5) ; les sujets témoins ne sont pas tout à fait de vrais témoins, puisque leur parenchyme testiculaire provient d'une gonade porteuse d'un séminome qui pourrait modifier la flore microbienne, même si le prélèvement est réalisé à distance de la zone tumorale ; le nombre et la diversité des bactéries identifiées chez les hommes ANOI pourraient avoir été sous-estimés car provenant du prélèvement sélectif de certains tubes lors du micro-TESE et non pas de la totalité de la pulpe testiculaire.

Il sera donc indispensable de confirmer ces intéressants résultats préliminaires montrant que le tissu testiculaire n'est pas microbiologiquement stérile et que la communauté bactérienne est déséquilibrée chez les hommes infertiles présentant une azoospermie non obstructive idiopathique, ce qui

nous laisserait penser que l'environnement bactérien testiculaire pourrait, comme pour d'autres microbiotes, jouer un rôle important dans la physiopathologie de la reproduction masculine.

Jacqueline Mandelbaum

Alfano M, Ferrarese R, Locatelli I et al. Testicular microbiome in azoospermic men: first evidence of the impact of an altered microenvironment. *Hum Reprod* 2018; 33:1212-7.

1. Weissenbach J et Sghir A. *Med Sci* 2016; 32: 937-943.
2. Ogawa T et al. *Nature Med* 2000; 6: 29-34.
3. Ryu BY et al. *Stem Cells* 2006; 24: 1505-1511.
4. Markle JG et al. *Science* 2013; 339: 1084-1088.
5. Baker JM et al. *Maturitas* 2017; 103: 45-53.
6. Biesalski HK. *Ann N Y Acad Sci* 2016; 1372: 53-64.
7. Lloyd-Price J et al. *Genome Med* 2016; 8: 51-61.
8. Cossart P. *CR Biologies* 2018; 341: 275. doi:10.1016/j.crv.2018.06.001
9. Alfano M et al. *Sci Rep* 2017; 7: 17638.
10. Schlegel PN. *Hum Reprod* 1999; 14: 131-135.
11. Johnsen SG. *Hormones* 1970; 1: 2-25.
12. Cosorich I et al. *Sci Adv* 2017; 3: e1700492. doi: 10.1126/sciadv.170049
13. Hou D et al. *Fertil Steril* 2013; 100: 1261-1269.
14. Weng SL et al. *PLoS One* 2014; 9: e110152.
15. Mariat D et al. *BMC Microbiol* 2009; 9: 123. doi: 10.1186/1471-2180-9-123
16. Yi-chao XU et al. *J Reprod Contracept* 2014; 24: 199-204.