

Quelle place pour le spermogramme automatisé en 2016 ?

J. Lammers^{1,2}, C. Springart^{1,2}, A. Reignier^{1,2}, A. Cateau^{1,3}, P. Barrière^{1,2,3}, T. Fréour^{1,2,3}

¹ Service de Médecine de la Reproduction, CHU de Nantes, Nantes

² Inserm UMR 1064, Nantes

³ Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes

L'analyse des paramètres spermatiques que constitue le spermogramme est le premier outil diagnostique permettant l'évaluation du versant masculin du couple infertile. Cet examen indispensable avant toute prise en charge ultérieure se doit d'être réalisé à plusieurs reprises en raison des variabilités intra-individuelles [1]. Les résultats qui sont obtenus lors de cet examen, ainsi que le contexte clinique de l'infertilité du patient et de sa conjointe, sont déterminants pour orienter la prise en charge du couple. L'examen manuel macroscopique et microscopique de l'échantillon reste actuellement la méthode de référence pour la réalisation du spermogramme dans la majorité des laboratoires. Cette analyse souffre de grandes variabilités intra- et inter-laboratoires et d'un manque de précision malgré les efforts fournis [2]. Les dernières recommandations de l'OMS, concernant l'analyse du sperme, publiées en 2010, ont permis de sensibiliser les laboratoires à la mise en place stricte des techniques décrites et ainsi de tendre vers la standardisation des procédures. La participation à des contrôles qualité internes au laboratoire ou externes par le biais de sociétés spécialisées ou d'autres laboratoires partenaires est également un moyen de réduire les variabilités entre opérateurs ou laboratoires.

Développés depuis plus de 20 ans, les automates de spermologie ont progressé jusqu'à constituer aujourd'hui une alternative intéressante à l'analyse manuelle du spermogramme, permettant d'associer fiabilité des résultats et variabilité minimale.

Le spermogramme manuel

Selon les recommandations de l'OMS, le spermogramme débute par une analyse macroscopique de l'échantillon [1]. Une fois le recueil effectué, le prélèvement est placé 30 minutes à 1 heure à liquéfier avant de pouvoir évaluer le volume de l'éjaculat, sa viscosité et son pH.

Dans l'heure qui suit le prélèvement, un examen microscopique d'un échantillon (10 µl) de l'éjaculat est réalisé par deux opérateurs indépendants, formés à la

spermologie. Lors de cet examen sont évalués ; le type de mobilité des spermatozoïdes (mobiles progressifs, mobiles sur place ou immobiles), leur vitalité et leur morphologie (sur un frottis), ainsi que la concentration en spermatozoïdes et en cellules rondes. Les deux opérateurs réalisent dans un même temps l'analyse de chacun des paramètres par deux comptages indépendants de 200 spermatozoïdes.

La combinaison des paramètres macroscopiques et microscopiques tels que le volume du prélèvement, la concentration en spermatozoïdes et leur mobilité permet le calcul du nombre de spermatozoïdes mobiles dans l'éjaculat. Cette donnée a une importance clinique majeure pour orienter la prise en charge du couple.

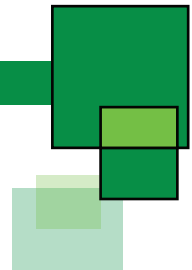
Des tests complémentaires aux analyses principales peuvent être réalisés ; la recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes, le test de migration-survie ou la spermoculture par exemple. Le spermogramme est une analyse chronophage nécessitant un personnel en nombre suffisant bénéficiant d'une formation continue adaptée et rigoureuse. Malgré tout, cette analyse reste subjective, tout particulièrement pour la mobilité et la morphologie qui sont des appréciations de caractéristiques de spermatozoïdes parmi d'autres. L'opérateur peut être inconsciemment influencé par les observations des prélèvements précédents et par la qualité générale de l'échantillon observé. De plus, cette analyse peut souffrir de variabilité intra- et inter-laboratoires et d'un manque de précision malgré les efforts fournis. Ce manque de standardisation démontré par plusieurs auteurs limite la pertinence clinique de cet examen [3-6].

Les limites que présente cet examen soulèvent des questions sur l'usage des automates en spermologie. Insuffisamment performants et non spécifiques dans les premières années, ceux-ci pourraient aujourd'hui apporter une solution aux difficultés rencontrées.

Le spermogramme automatisé

Principe de fonctionnement des automates

Utilisés en spermologie dans le milieu vétérinaire depuis



plusieurs décennies, les automates se sont installés sur le marché de la biologie de la reproduction humaine depuis une quinzaine d'années. Les problématiques de diagnostic n'étant pas les mêmes, certaines caractéristiques du sperme humain étaient à l'origine d'un manque de fiabilité des résultats obtenus [7]. Il n'y a eu que peu de changement du principe de fonctionnement de ces automates, mais de grandes améliorations ont été apportées aux algorithmes. Il existe aujourd'hui deux catégories d'automates de spermologie, chacune basée sur des principes de détection différents.

Le plus ancien, le système CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*), consiste en une acquisition d'images successives d'un échantillon (< 20 µl) de l'éjaculat à l'aide d'un microscope équipé d'une caméra. Les images ainsi obtenues sont ensuite analysées pour discriminer les spermatozoïdes mobiles des immobiles et analyser le type de mouvement (mobilité progressive ou mobilité sur place), ainsi que les paramètres de vitesse de déplacement non analysables à l'œil. L'expertise de l'opérateur est requise pour régler et ajuster le réglage optique afin d'obtenir des images utilisables et éviter les biais d'analyse. La morphologie est évaluée à partir d'un frottis réalisé après lavage de l'éjaculat. Des mesures automatisées de la tête des spermatozoïdes sur les images de frottis permettent de classer le spermatozoïde comme normal ou anormal. Différentes versions des automates existent, les plus évoluées étant équipées d'une platine motorisée permettant l'acquisition séquentielle de plusieurs champs microscopiques. Les autres versions imposent à l'opérateur de passer manuellement d'un champ à l'autre. Des logiciels spécifiques permettent la réalisation de tests complémentaires, comme la vitalité ou l'analyse de la fragmentation des noyaux des spermatozoïdes. Plusieurs sociétés commercialisent ce type d'automate. On peut citer par exemple le modèle IVOS de chez Hamilton Thorne ou le modèle *Sperm Class Analyzer* (SCA) de chez Nikon (liste non exhaustive).

Le système *Sperm Quality Analyser* (SQA) de chez Medical Electronic Systems est basé sur l'analyse d'un signal lumineux à travers un échantillon (environ 500 µl) de l'éjaculat à étudier à l'aide d'un spectrophotomètre. Ce signal analysé par l'automate permet de définir la concentration en spermatozoïdes et celle en spermatozoïdes mobiles pour enfin déduire la concentration en spermatozoïdes immobiles. Des paramètres cinétiques peuvent aussi être obtenus. La morphologie spermatique est basée sur une estimation calculée à partir des résultats précédents à l'aide d'un algorithme spécifique. Le spermogramme complet est ainsi disponible très rapidement et sans intervention de l'opérateur, sauf en cas d'alarme de l'appareil, par exemple à cause d'une interférence de débris ou dans le

cas d'une oligospermie sévère. Dans ces cas, l'intervention et l'expertise de l'opérateur sont indispensables.

Performances analytiques

Plusieurs équipes ont étudié la corrélation des résultats rendus par les différents automates sur le marché. Concernant la numération en spermatozoïdes, les systèmes CASA et SQA ont été démontrés comme fiables [8, 9]. Il existe néanmoins certaines limites dans le système CASA propre aux caractéristiques du sperme humain, notamment quand celui-ci contient de nombreuses cellules et débris que le logiciel peut compter comme des cellules. Il est alors de la responsabilité de l'opérateur de détecter ces dérives et d'appliquer les bons paramétrages [10]. Concernant la présence de cellules rondes et débris, le SQA contient des algorithmes permettant leur prise en compte quand l'opérateur a défini le programme adapté à l'analyse. Le volume de l'échantillon analysé par l'automate rentre aussi en compte : pour le cas du SQA, le volume important analysé permet d'obtenir un résultat plus représentatif de l'éjaculat, mais peut être pénalisant en cas de faible volume initial. Concernant les systèmes CASA, il existe des chambres de lecture de profondeurs différentes (5 à 20 µl) où les répartitions en spermatozoïdes peuvent être inhomogènes, ceci étant principalement en lien avec la viscosité de l'échantillon et le chargement de la chambre de lecture. Selon le modèle d'automate, le choix des zones à étudier est aléatoire ou sélectionné par l'opérateur.

L'étude de la mobilité des spermatozoïdes peut être influencée par des effets de mouvement de flux dans la chambre d'analyse ou des collisions entre les spermatozoïdes, mais aussi la mobilité environnante des autres spermatozoïdes qui peut induire un mouvement des spermatozoïdes immobiles. Néanmoins, nous avons démontré que les résultats de mobilité obtenus avec les 2 types d'automates sont comparables avec ceux obtenus en appliquant strictement les recommandations de l'OMS [9]. Les automates permettent aussi d'étudier des paramètres non analysables par l'œil humain que sont les vitesses de déplacement des spermatozoïdes et des paramètres cinétiques (vitesse progressive, vitesse curvilinéaire, vitesse moyenne, linéarité, amplitude de débattement latéral de la tête, index de mobilité spermatique...). Cependant, l'OMS ne définit pas de seuil de normalité à ces résultats, et leur intérêt en assistance médicale à la procréation reste discuté.

L'étude de la morphologie à l'aide des systèmes CASA est plus chronophage qu'une évaluation manuelle au microscope, car celle-ci consiste en de multiples mesures sur les images des spermatozoïdes après préparation d'un frottis obtenu après lavage. De plus, la plupart des systèmes se limitent à l'analyse de la tête et de la pièce

intermédiaire du spermatozoïde mais pas du flagelle, et nécessite un frottis de bonne qualité avec des spermatozoïdes bien individualisés et peu de débris et cellules rondes. Elle est néanmoins très précise puisque les mesures sont faites sur chaque spermatozoïde. L'estimation de morphologie obtenue avec le système SQA est le fruit d'un algorithme tenant compte des résultats de mobilité et des paramètres cinétiques. Nous avons également démontré que ces résultats sont acceptables [9].

Avantages et inconvénients

Les avantages des automates de spermologie sont multiples. Tout d'abord, les analyses automatisées sont généralement plus rapides que les analyses réalisées manuellement en appliquant strictement les recommandations de l'OMS. De plus, l'assistance informatique permet à l'analyse d'être réalisée sur un plus grand nombre de cellules, les résultats obtenus étant ainsi plus précis qu'en comptage manuel. L'influence de l'opérateur sur l'évaluation des cellules étudiées étant réduite, les paramètres étudiés le sont de façon plus objective et plus reproductible (certains systèmes CASA nécessitent néanmoins une intervention pour le choix de la zone à étudier ainsi que pour la mise au point sur les cellules). Cependant, la formation du personnel à l'utilisation des automates, bien que plus simple que la formation à la spermologie manuelle, se doit d'être rigoureuse d'un point de vue théorique et pratique afin de garder un œil critique sur les résultats rendus par l'automate. Les systèmes automatisés permettent également un archivage des données avec images et vidéos qui sont, en plus d'éléments médico-légaux, de très bons supports à la formation du personnel. En revanche, il n'existe pas d'étude technico-économique à ce jour pour déterminer l'intérêt financier de s'équiper de ce type d'appareil, et chaque équipe doit faire la balance entre les bénéfices en terme de qualité analytique et de temps technique, et les coûts en termes d'achat de la machine et de consommables pour décider de l'intérêt de mettre en place cette stratégie au laboratoire de spermologie.

Conclusion

Les automates de spermologie apportent des résultats largement acceptables et plus fiables que ceux obtenus en analyse manuelle. De plus, leur rendement élevé permet d'augmenter le nombre d'analyses réalisées dans un laboratoire de spermologie diagnostique. Néanmoins, la formation des opérateurs reste primordiale pour assurer une expertise de cet examen central dans la décision de la

prise en charge des patients. Il est à la charge de chaque laboratoire d'évaluer, selon son activité, le bénéfice apporté par rapport au coût d'utilisation de ces systèmes et de définir ensuite l'équipement qui sera le mieux adapté à ses besoins et à ses attentes.

Références

- 1- World Health Organization (2010) WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edn. World Health Organization, Geneva.
- 2- Penn HA et al. National semen World Health Organization guidelines 10 years later. *Fertil Steril.* 2011;95:2320-3.
- 3- Filimberti E et al. High variability in results of semen analysis in andrology laboratories in Tuscany (Italy) : the experience of an external quality control programme. *Andrology.* 2012;1:401-7.
- 4- Walczak-Jedrzejowska R et al. Semen analysis standardization : is there any problem in Polish laboratories? *Asian Journal of Andrology.* 2013;15:616-21.
- 5- Mallidis C et al. Ten years' experience with an external quality control program for semen analysis. *Andrology.* 2012;98:611-6.
- 6- Lu JC et al. A survey on the status of semen analysis in 118 laboratories in China. *Asian Journal of Andrology.* 2010;12:104-10.
- 7- Mortimer ST et al. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian J Andr.* 2015;17:545-53.
- 8- Dearing et al. Validation of the sperm class analyser CASA system for sperm counting in a busy diagnostic semen analysis laboratory. *Hum Fertil (Camb).* 2014;17:37-44.
- 9- Lammers J et al. Double-blind prospective study comparing two automated sperm analyzers versus manual semen assessment. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31:35-43.
- 10- Tomlinson MJ et al. Validation of a novel computer-assisted sperm analysis (CASA) system using multitarget-tracking algorithms. *Fertil Steril.* 2010;93:1911-20. ■