

ETUDE COMPARATIVE DE 3 METHODES D'ANALYSE DU SPERME

P. Kamtchouing*, F. Schoonjans**, L. Vermeulen**, F. Comhaire**

*Département de Biologie et Physiologie Animales, Université de Yaoundé, Cameroun

**Département d'Endocrinologie, Hôpital Universitaire de Gand.

Adresse pour correspondance : Dr Frank Comhaire, Hôpital Universitaire 9K12, De Pintelaan 185, 9000 Gand - Belgique.

COMPARATIVE STUDY BETWEEN THREE METHODS OF SEMEN ANALYSIS.

A comparative study between three methods of semen analysis reveals that the full automated CMA system gives higher values for sperm concentration than the mean of the three methods, probably due to misclassification of debris as sperm cells, whereas the semi-automatic Autosperm method and the conventional manual method identify spermatozoa in the microscopic field. The Autosperm method provides more reproducible results for concentration and velocity parameters and its values are better correlated with the manual method as recommended by the World Health Organization. **Key words :** Semen analysis, Autosperm, CMA, Informatics. **Andrologie 1991, 1 : 62-65.**

En andrologie, l'une des étapes la plus importante du diagnostic en matière d'infertilité est l'analyse du sperme. La concentration, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes sont les critères qu'on utilise en routine pour essayer d'évaluer la fertilité masculine. De ce fait, le spermogramme est la pierre angulaire des investigations (12). Cependant, la méthode d'analyse conventionnelle, manuelle, dans la plupart des laboratoires, donne des résultats subjectifs fonction de l'expérience de l'opérateur. Cette subjectivité entraîne des variations importantes des valeurs obtenues dans différents laboratoires, rendant difficile l'interprétation des résultats (12). Plusieurs auteurs ont essayé de déterminer la concentration minimale nécessaire à la fertilité masculine ; ce chiffre est passé de 60 millions/ml (9) à 5 millions/ml (10). Pour des raisons pratiques, l'OMS a recommandé une valeur seuil de 20 millions/ml (13). Pourtant, il est presque impossible de différencier un homme infertile d'un homme fertile en se basant uniquement sur la concentration ; par contre, l'analyse du mouvement des spermatozoïdes permet une meilleure discrimination. Le taux des spermatozoïdes ayant une progression linéaire constitue un critère distinctif important entre des hommes fertiles et hypofertiles (4). De

plus, la vitesse des spermatozoïdes est bien corrélée au potentiel de fécondation des oocytes soit humains (7), soit de hamster (1). Cependant, il est difficile d'évaluer la mobilité en routine. Dans les laboratoires qui utilisent la méthode manuelle conventionnelle (13), les résultats dépendent de l'expérience de l'opérateur.

De nos jours les progrès techniques ont permis le développement de plusieurs méthodes d'analyse plus objectives du sperme. Ces méthodes font appel à la photographie, la vidéo-micrographie (7) et à l'analyse des images par ordinateur. En 1988, Hinting et al ont développé une méthode objective semi-automatique permettant de déterminer les caractéristiques du mouvement du spermatozoïde. L'objectif de notre travail est de comparer cette technique semi-automatique à la technique complètement automatisée avec vidéo-micrographie, afin de déterminer leurs correspondances et différences. Nous avons également comparé chacune de ces deux méthodes objectives à la méthode manuelle telle qu'elle a été recommandée par l'OMS.

MATERIELS ET METHODES

Sujets

Tous les sujets (n=66) impliqués dans cette étude étaient soit des partenaires masculins de couples venus consulter pour infertilité au service d'Andrologie de l'Hôpital Universitaire de Gand, soit des donateurs volontaires participant au programme de procréation médicalement assistée. Le sperme fut recueilli selon les recommandations de l'OMS (13).

Equipements

Autosperm : Cette méthode semi-automatique est basée sur l'utilisation d'une table digitale, équipée d'un curseur muni d'un point lumineux, d'un ordinateur, d'un microscope équipé d'un tube à dessin permettant de voir simultanément le champ du microscope et la table digitale sur une surface de 100 x 100 µm, divisée en 25 carreaux (5 x 5). L'analyse s'effectue à un grossissement de 500 x (40 x 12,5). Le mouvement de chaque spermatozoïde se trouvant dans le champ de comptage est suivi à la main grâce au curseur muni de quatre boutons : le premier bouton est pressé pour compter les spermatozoïdes mobiles, le deuxième pour les immobiles, le troisième est pressé à la fin de chaque série de comptage et le quatrième pour interrompre l'analyse. Toutes les données

sont transmises à l'ordinateur programmé pour calculer différents paramètres parmi lesquels les vitesses curvélinaire et linéaire, la mobilité, la concentration, ainsi que le pourcentage des spermatozoïdes de classes a, b, c ou d. Les paramètres de la méthode sont les suivants : temps d'observation 2, 4 sec, mobilité grade a : vitesse linéaire 22 µm/sec ou plus, grade b : vitesse linéaire inférieure à 22 µm/sec et vitesse de trajet supérieure à 5 µm/sec, grade c : vitesse de trajet inférieure à 5 µm/sec, grade d : immobile.

Cell motion analyzer (CMA) : Le "cell motion analyzer" (CMA, Strömberg-Mika, Bad Feilnbach, Allemagne) est une nouvelle méthode complètement automatisée. C'est un système vidéo d'analyse d'image ; la caméra reliée au microscope projette l'image sur un écran. Les données sont transmises à un ordinateur programmé pour déterminer les différents paramètres comme concentration des cellules, pourcentage des immobiles et des mobiles, et vitesses. Il présenterait certains avantages : reconnaissance des spermatozoïdes dont les trajectoires se croisent alors que les anciens systèmes les ignoraient ou en comptaient 4 au lieu de 2 (11). De plus, la discrimination entre spermatozoïdes et débris cellulaires se ferait grâce à la détection du flagelle, ce qui éliminerait la prise en compte des débris cellulaires comme avec les anciens systèmes qui tenaient compte de la tête du spermatozoïde.

Les paramètres de la méthode sont : temps d'observation de 1 seconde, vitesse limite des cellules "immobiles" : 5 µm/sec, vitesse limite des cellules à motilité dite non-progressive : 10 µm/sec.

Méthode manuelle ou conventionnelle : Afin d'évaluer manuellement la concentration des spermatozoïdes en millions/ml, le sperme est dilué dans la solution de Haeyem et compté dans une cellule de comptage (Burker) sous un grossissement de 500 X. Le pourcentage de cellules mobiles est estimé grâce au compteur manuel (Clay Adams), permettant de distinguer quatre catégories de cellules selon les critères recommandés par l'OMS (13):

- grade a: spermatozoïdes ayant une mobilité rapide, progressive et linéaire
- grade b: spermatozoïdes ayant une mobilité lente, progressive ou non linéaire
- grade c: spermatozoïdes ayant une mobilité non progressive

CETTE ETUDE A BENEFICIE D'UNE BOURSE DE FORMATION A LA RECHERCHE.

- grade d: spermatozoïdes immobiles

Méthodes

Préparation des échantillons pour l'Autosperm : Après liquéfaction, un aliquot de 11,5 µl de sperme est déposé sur une lame et recouvert d'une lamelle de 24x24 mm donnant ainsi une profondeur de 20 µm (5).

Préparation des échantillons pour le CMA : Dans un premier temps, le CMA a été utilisé comme l'avait installé l'ingénieur, utilisant une cellule de comptage de 15 µm de profondeur. Cela nécessitait souvent des dilutions de sperme dans un liquide physiologique (résultat du 1er groupe). Dans un deuxième temps, nous avons modifié les paramètres d'analyse, les conditions de travail, et procédé à l'analyse du sperme sans dilution, dans les mêmes conditions qu'avec l'Autosperm (résultats du 2ème groupe).

Statistiques

Nous avons calculé les coefficients de corrélation et de régression linéaire, ainsi que la méthode de Bland & Altman (3). Cette méthode est basée sur la représentation des différences par rapport à la moyenne des valeurs entre deux méthodes qu'on compare. Etant entendu qu'aucune méthode n'est supposée donner les résultats "exacts", la moyenne des valeurs serait plus "réelle". Cette méthode permet de mieux observer graphiquement la distribution des différences et de représenter la moyenne et l'erreur à la moyenne.

Chaque méthode (Autosperm, CMA ou Manuelle) a ainsi été comparée soit à la moyenne des trois méthodes, soit à une autre technique, c'est à dire Autosperm-CMA, Autosperm-manuelle, CMA-manuelle.

RESULTATS

Comparaison entre les trois méthodes

Elle est illustrée en ce qui concerne la concentration (n=16) et la mobilité (n=15) dans les figures 1 et 2.

Comparaison entre Autosperm et CMA

Il faut ici considérer deux types de résultats : les résultats avec le CMA telle que le fournisseur l'a installé (1^{er} groupe) et les résultats après nos modifications (2ème groupe).

Concentration (=52) : Le coefficient de corrélation est de 0,78 (p<0,0001).

Pour les concentrations <40 millions/ml, la concordance semble bonne car la différence Autosperm-CMA est proche de 0. Cependant, lorsque le CMA indique plus de 40 millions/ml elles sont soit supérieures à la moyenne (1er groupe) soit inférieures à la moyenne (2ème groupe).

Mobilité (n=47) : La droite de régression montre une diminution de concordance au fur et à mesure que le pourcentage de mobilité augmente ce qui est confirmé par un faible coefficient de corrélation r=0,61 (p<0,0001). Cependant ce coefficient r passe de 0,37 (p<0,05) dans le 1er groupe à 0,80 (p<0,0001) dans le 2ème groupe. L'analyse statistique par méthode de Bland & Altman donne des valeurs positives indiquant que le CMA relève moins de cellules mobiles que l'Autosperm.

Vitesse et Vitesse linéaire (n=45) : Pour la vitesse, il n'y a pas de correspondance entre les deux méthodes objectives. Le coefficient de corrélation r=0,20 (p<0,19). Il est donc très faible quoiqu'amélioré par nos modifications (0,42 dans le 1er groupe, p<0,07, contre 24 dans le 1er groupe, p<0,23). L'analyse par la méthode de Bland & Altman confirme la différence : le CMA donne des résultats inférieurs à l'Autosperm (1er groupe), et nos modifications inversent cette tendance (2ème groupe).

En ce qui concerne la vitesse linéaire, les deux méthodes objectives (Autosperm et CMA) donnent également des résultats discordants, sans aucune corrélation. Le coefficient r n'est que de 0,15 (p<0,34) quoique nous l'ayons amélioré par nos modifications de 0,15 (p<0,45) à 0,42 (p<0,34).

Reproductibilité : La reproductibilité de chaque méthode a été testée en analysant dix fois le même échantillon afin d'établir la variation intra-essai (tableau 1). Il apparait clairement que les variations sont plus importantes avec le CMA quel que soit le paramètre étudié. Ces variations sont en moyenne 1,5 fois supérieures à celles de l'Autosperm. De plus les résultats de l'Autosperm pourraient s'améliorer avec l'expérience du technicien.

Tableau 1 : Coefficients de variation.

	CMA (paramètres optima)	AUTOSPERM (technicien inexpérimenté)	AUTOSPERM (technicien expérimenté)
Concentration	29	20	8
Mobilité	34	23	11
Vitesse	17	12	6
Vitesse linéaire	26	14	6
RATIO	1.55	1	0,45

Comparaison entre Autosperm et méthode manuelle

Concentration (n=66) : Nous avons trouvé une concordance entre les deux méthodes car presque

tous les points étaient situés sur la droite Y=X. En effet, la pente de la droite de régression linéaire est de 1,01 et le point d'intersection avec l'axe des abscisses de 0,21. Le coefficient de corrélation est également élevé : r=0,96 (p<0,0001).

Jusqu'à une concentration de 100 millions/ml de spermatozoïdes on trouve une très bonne concordance entre les deux méthodes. Au delà, l'Autosperm donne des valeurs supérieures à celles de la méthode manuelle.

Mobilité (n=65) : L'analyse de la régression linéaire montre qu'il y a une concordance certaine entre les deux méthodes car le r est significatif (0,84, p<0,0001). Cependant, l'on note une discordance au fur et à mesure que le pourcentage des cellules mobiles augmente.

Comparaison entre CMA et Méthode manuelle

Concentration (n=16) : Malgré un r à 0,89 (p<0,0001), on trouve une discordance entre les deux méthodes. Les concentrations obtenues avec le CMA sont supérieures à celles obtenues avec la méthode manuelle. De plus la moyenne des différences et la déviation standard (respectivement 19,2 et 40), sont plus élevées que celles de la comparaison Autosperm-méthode manuelle (4,8 et 35).

Mobilité (n=16) : La concordance est mauvaise malgré un coefficient de corrélation à 0,79 (p<0,0001). De plus, l'analyse selon Bland & Altman indique que le pourcentage de cellules mobiles obtenu avec le CMA est inférieur à celui de la méthode manuelle.

DISCUSSION

L'étude a consisté à comparer les résultats de l'évaluation de différents paramètres du spermogramme (concentration, mobilité, vitesse et linéarité) par 3 méthodes (CMA, Autosperm et manuelle).

La comparaison des résultats de chaque méthode prise séparément à la moyenne des trois méthodes montre que les concentrations obtenues avec le CMA sont supérieures à la moyenne, alors que celles obtenues avec l'Autosperm et la méthode manuelle en sont plus proches. Ceci serait dû à la prise en considération des débris cellulaires par le système vidéo-micrographique du CMA. En effet, dans certains cas d'oligospermie sévère (concentration<2millions/ml), le CMA affiche une concentration de 8 à 12 millions/ml. Ce problème des débris ne se pose pas avec l'Autosperm et la méthode manuelle car l'opérateur doit suivre chaque spermatozoïde au microscope. Quant à la mobilité, le CMA donne un pourcentage de cellules mobiles inférieur à la moyenne. Ceci pourrait être lié au fait que le

CMA identifie comme spermatozoïdes des débris cellulaires immobiles d'où surestimation de la concentration et sous-estimation de la mobilité. La mobilité est surestimée par la méthode manuelle suggérant un biais dans la sélection des spermatozoïdes lors de ce type de comptage. Cette surestimation est d'autant plus importante que le pourcentage des spermatozoïdes mobiles est élevé, attestant ainsi des limites de la méthode manuelle.

La comparaison des deux méthodes objectives Autosperm et CMA montre que leurs résultats sont tout à fait discordants tant au niveau de la concentration que de l'analyse du mouvement des spermatozoïdes. Ceci peut s'expliquer par plusieurs raisons : pour la concentration, il y a prise en compte de cellules différentes des spermatozoïdes par la caméra du CMA ; ceci fausse les résultats en cas d'oligospermie sévère ou d'azoospermie. Schneider et al (11) ont déjà rapporté l'absence de fiabilité du CMA pour des concentrations inférieures à 5-10 millions/ml, ce qui serait dû au fait que plusieurs champs microscopiques sont utilisés pour l'analyse du sperme. De plus ils ont souligné le défaut de la cellule de comptage ; l'ayant remarqué nous avons amélioré nos résultats en procédant à une analyse directe du sperme entre lame et lamelle (résultats du 2ème groupe). Knuth et al (8) avaient noté dès 1987 ce problème des débris cellulaires dans les systèmes analyseurs d'images. Pourtant le système CMA est supposé reconnaître le spermatozoïde grâce à son flagelle. Nous n'avons pas pu confirmer cette capacité. Par contre les croisements des spermatozoïdes sont bien individualisés, et on peut les observer sur l'écran contrôlé.

En ce qui concerne le mouvement, le problème est plus complexe car il est lié aux paramètres programmés dans chaque système. Il est à noter que des spermatozoïdes peuvent être classés "immobiles" par la méthode CMA si leur vitesse de déplacement est comprise entre 0,1 et 4,9 $\mu\text{m}/\text{sec}$. De plus, le CMA ne précise pas le type de mobilité, c'est à dire progressive, linéaire ou non linéaire. Ceci est un inconvénient car plusieurs auteurs ont montré l'importance de la qualité du mouvement du spermatozoïde dans la fertilité de l'homme (2, 4).

Les différents paramètres de l'Autosperm ont été adoptés après étude comparative avec la méthode conventionnelle (6). La méthodologie de la mesure de la vitesse diffère pour les deux méthodes : pour le CMA, le centre de la tête du spermatozoïde sert de point de repère pour suivre sa trajectoire, alors que l'Autosperm mesure le déplacement de la pièce intermédiaire. Les deux

parties du spermatozoïde n'ayant pas la même cinétique de mouvement, il est possible qu'en fait les deux systèmes ne mesurent pas les mêmes paramètres.

Les données fournies par l'Autosperm et le CMA diffèrent et il est difficile de trouver une concordance. Hinting et al (5) ont démontré que le temps d'observation influence les paramètres de la mobilité. Pour l'Autosperm ce temps est de 2,4 secondes, et il n'est que de 1 seconde pour le CMA, ce qui pourrait expliquer les discordances de vitesse et de linéarité. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle les résultats des spermogrammes fournis par analyseur d'image dépendent en grande part des données programmées (8).

Il restera donc hasardeux de comparer les résultats de différents laboratoires tant que ces données ne seront pas standardisées. Néanmoins, lorsque l'on compare chacune des méthodes objectives à la méthode manuelle, l'on constate

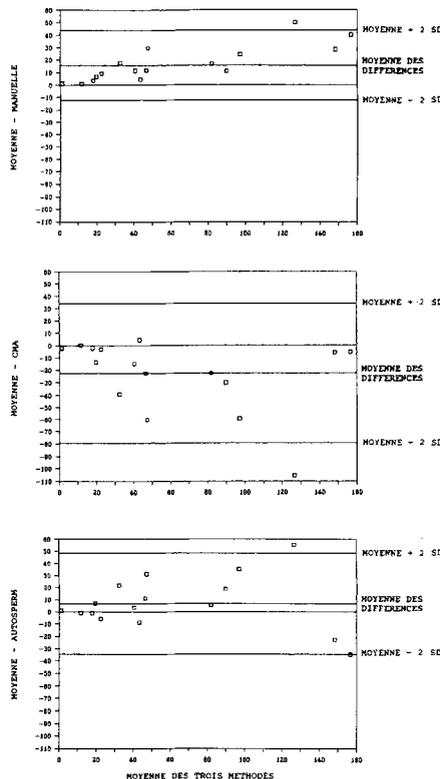


Figure 1 : Comparaison entre la valeur moyenne des concentrations en spermatozoïdes (millions/ml) fournies par les 3 méthodes étudiées (abscisse) et la différence entre la valeur fournie par chaque méthode et la valeur moyenne (ordonnée) (Selon Bland et Altman, 3). Les concentrations mesurées par méthode manuelle sont inférieures à la moyenne puisque leur différence avec la moyenne des trois méthodes est supérieure à 0. Les résultats du CMA sont supérieurs à la moyenne et les variations sont plus importantes (au milieu). Les données fournies par l'Autosperm sont les plus proches de la moyenne avec une déviation standard intermédiaire (en bas).

que tant au niveau de la concentration qu'à celui de la mobilité, Autosperm et la méthode manuelle sont mieux corrélés. Ceci serait dû au fait que dans les deux cas l'opérateur peut individualiser les cellules dans le microscope et suivre leur mouvement. Ce contrôle est impossible avec le CMA, complètement automatisé. Par ailleurs, se pose le problème de la reproductibilité du système CMA, quelque que soit le paramètre considéré.

En conclusion, cette étude démontre les limites de l'analyse du sperme avec le système analyseur d'image CMA.

Remerciements

Nous remercions la société allemande Strömberg-Mika de nous avoir prêté le CMA pour cette étude, ainsi que le Fonds National Belge pour la Recherche Scientifique pour son support financier.

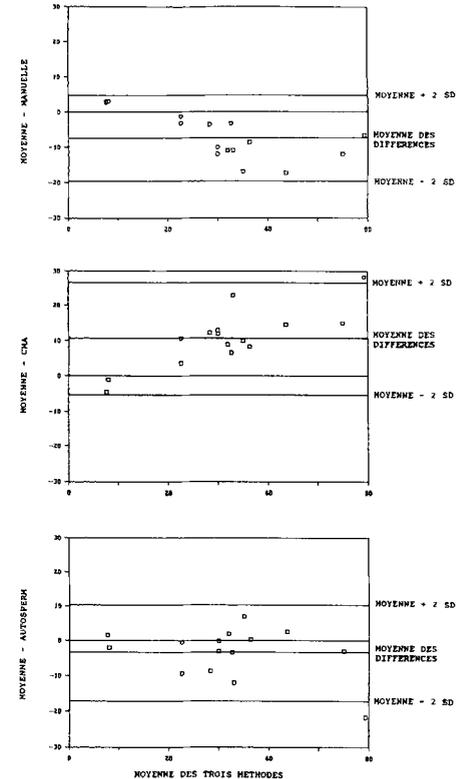


Figure 2 : Comparaison entre la valeur moyenne des pourcentages de spermatozoïdes mobiles (grade a + grade b) fournis par les 3 méthodes étudiées, et la différence entre la valeur fournie par chaque méthode et la valeur moyenne. La tendance est inverse de celle enregistrée pour la concentration. Les résultats obtenus par méthode manuelle sont, en général, supérieurs à la moyenne puisque la différence est négative (en haut). Le CMA donne une mobilité inférieure à la moyenne des trois méthodes. Les résultats de l'Autosperm sont les plus proches de cette moyenne. La dispersion des différences (déviations standard) est maxima pour la méthode CMA et similaire pour les deux autres techniques.

REFERENCES

- 1 - Albertsen PC, Chang TSK, Vindivich D, Robinson JC, Smyth JW. A critical method of evaluating tests for male infertility. *J. Urol.*, 1983, 130 : 467-475.
- 2 - Aitken RJ, Best FM, Richardson DW, Djahanbakch O, Lees MM. The correlates of fertilizing capacity in normal fertile men. *Fertil. Steril.*, 1982, 38 : 68-76.
- 3 - Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1986, 1 : 307-310.
- 4 - Comhaire FH, Vermeulen L, Schoonjans F. Reassessment of the accuracy of traditional sperm characteristics and adenosine triphosphate (ATP) in estimating the fertilizing potential of human semen in vivo. *Int. J. Androl.*, 1987, 10 : 653-662.
- 5 - Hinting A, Schoonjans F, Comhaire F. Validation of a single-step procedure for the objective assessment of sperm motility characteristics. *Int. J. Androl.*, 1988, 11 : 277-287.
- 6 - Hinting A, Comhaire F.H., Schoonjans F. Capacity of objectively assessed sperm motility characteristics in differentiating between semen of fertile and subfertile men. *Fertil. Steril.* 1988, 50 : 635-639.
- 7 - Holt W.V., Moore HDM, Hillier SG. Computer assisted measurement of sperm swimming speed in human semen : correlation of results with in vitro fertilization assays. *Fertil. Steril.*, 1985, 44 : 112-119.
- 8 - Knuth UA, Yeung C-H, Nieschlag E. Computerized semen analysis : objective measurement of semen characteristics is biased by subjective parameter setting. *Fertil. Steril.*, 1987, 48 : 118-124.
- 9 - Macomber D, Sanders MB. The spermatozoa count ; its value in diagnosis, prognosis and treatment of sterility. *New Engl. J. Med. Zoo.* 1929, 200 : 981-984.
- 10 - Peng H.Q., Collins J.A., Wilson EH, Wrixon W. Receiver-operating characteristics curves for semen analysis variables : methods for evaluating diagnostics tests of male gamete function. *Gamete Res.*, 1987, 17 : 229-236.
- 11 - Schneider U, Gehring W.G., Bürkle K. Computer assisted semen analysis with the SM Motionanalyzer : a new approach. Présentation au Congrès de la Fertility Society of Australia, Perth, Septembre 1990.
- 12 - World Health Organization. Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int. J. Androl.*, 1987, Suppl. 7.
- 13 - World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, 1987

RESUME : L'étude comparative de trois méthodes d'analyse de sperme indique que la méthode automatisée CMA donne des concentrations supérieures à la moyenne, probablement du fait de la prise en compte par le système d'analyse d'images des débris cellulaires, alors que la méthode semi-automatique et la méthode manuelle permettent d'individualiser les cellules sur le champ du microscope. Outre le fait que l'Autosperm donne des résultats plus reproductibles quelque soit le paramètre considéré, ses valeurs sont mieux corrélées avec ceux de la méthode manuelle qu'avec ceux de la méthode CMA. **Mots clés** : Spermogramme, Autosperm, CMA, Informatique. **Andrologie, 1991, 1 : 62-65.**