

Le spermogramme et le spermocytogramme virtuels. Apport de la " toile " au Contrôle de Qualité Externe et à la formation en spermiologie. Le site www.spermionet.com

Bernard FOLIGUET*, Jean Pascal SIEST**, Hervé GAUTIER***, Catherine WURTZ*
Thierry FORGES*

* Laboratoire de Biologie de la Reproduction et du développement, Maternité Régionale Universitaire de NANCY, CECOS Lorraine.

** Biologie Prospective, Technopôle de Brabois, VILLERS lès NANCY.

*** OLYMPUS-France, RUNGIS

RESUME

Le spermogramme et le spermocytogramme sont les examens de base pour l'abord biologique du diagnostic des hypofertilités et des stérilités masculines.

Le site de Biologie Prospective – Nancy - France (www.spermionet.com) propose aux biologistes des outils pédagogiques modernes, adaptés pour un travail et une pédagogie communs par Internet.

Le but de ce travail est la mise au point de documents numérisés nouveaux pour leur utilisation sur la « toile » dans le cadre du contrôle de qualité externe et de la formation continue en spermiologie.

La lame virtuelle rend possible un véritable contrôle de qualité externe en cytologie spermatique. Des documents numérisés de séquences de mobilité, obtenus à partir d'un microscope à contraste de phase fond noir ont été compressés puis diffusés sur le net.

Ces nouveaux outils, dont les documents ont été évalués par plus de 470 laboratoires, permettent de plus un travail de collaboration multicentrique sur la codification aussi bien des atypies des spermatozoïdes que des différentes classes de mobilité.

Mots clés : sperme humain, contrôle qualité externe, lame virtuelle, mobilité

I. INTRODUCTION

Près d'un couple sur cinq consultera pour ce qu'il considère comme une « difficulté à procréer ». Les examens biologiques détecteront pour 50% de ces couples une anomalie du sperme [3], parfois en relation avec une hypofertilité féminine qui révélera l'hypofertilité masculine.

Le test de Hühner, le spermogramme et le spermocytogramme sont les examens de base en spermiologie humaine. Ils nécessitent une rigueur dans les différents temps de leur pratique (pré, per et post analytiques) et une formation initiale et continue spécifiques.

Du fait de la subjectivité des examens cytologiques (spermocytogramme) et des données dynamiques (quantification de la mobilité des spermatozoïdes au spermogramme), il apparaît nécessaire de travailler de façon collaborative entre tous les laboratoires de spermiologie pour affiner les résultats fournis aux cliniciens en charge de ces couples.

Le web est un outil prodigieux de communication, permettant aux internautes biologistes de dialoguer, de définir et d'organiser entre eux la codification de leurs observations [2].

Correspondance :

Pr Bernard FOLIGUET - Laboratoire LBDR, Maternité Régionale Universitaire, Rue du docteur HEYDENREICH, 54000 Nancy, France. - Tel 03 83 41 13 61 - Email b.foliquet@maternite.chu-nancy.fr

Le but de ce travail a été de mettre en place sur Internet des outils pédagogiques spécifiques de formation initiale, continue et de contrôle de qualité externe (CQE) en spermologie, en particulier pour les deux temps essentiels que sont l'estimation des atypies (spermocytogramme) et des anomalies dynamiques (mobilité) des spermatozoïdes.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Le spermocytogramme virtuel

Des lames de spermocytogramme ont été préparées selon les directives de l'OMS [4] et colorées par la coloration cytologique de Harris Shorr. Les lames ont été numérisées par une station Olympus (*Digital Virtual Microscopy slide - Figure 1*) comprenant un microscope optique (BRX51 TRF), muni d'objectifs 20, 40 et 100 immersion (NA :1,40 UPLASAA/PO/100/O), couplée à une caméra couleur (1,4M Pixels *Firewire 2/3*). Une platine motorisée automatique est asservie pour assurer un déplacement programmé en X et Y, et une mise au point automatique en Z de chacune des plages scannées. Une station informatique de travail (*Dual Xeon™ Technology*) assure la programmation des déplacements de la lame, la mise au point, la prise de clichés pour chaque plage analysée, leur compression, leur liaison et leur conversion pour la mise en ligne sur le web. Le système EFI (*Extended Focal Imaging*) permet une amélioration de la vision en profondeur de champ pour chaque plage numérisée.

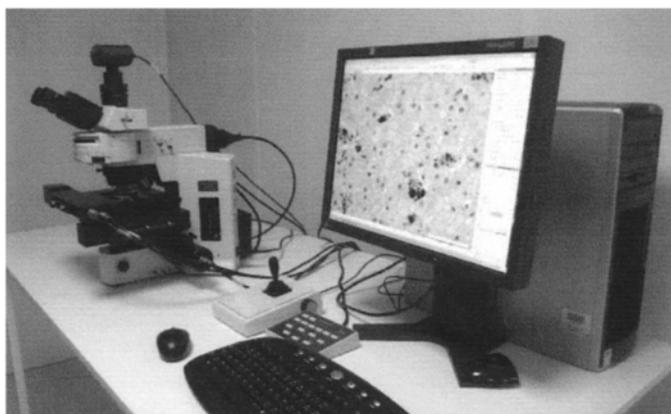


Figure 1 : Microscope et station de lame virtuelle. Olympus (*Digital Virtual Microscopy slide*).

Les données numérisées ont été stockées sur le site www.spermionet.com (Stabiligen-Biologie Prospective). La transmission et la restitution des différentes plages liées est obtenue à distance grâce à un « viewer » accessible gratuitement et automatiquement (*Soft Imaging System*), permettant au bout de la « toile » une vision microscopique de toute la lame, avec des grossissements par zooms progressifs ou par pas d'objectifs (**Figure 2**).

2. Pour la restitution à distance des observations de mobilité

Après liquéfaction une heure à l'étuve à 37°C, 20 µL de

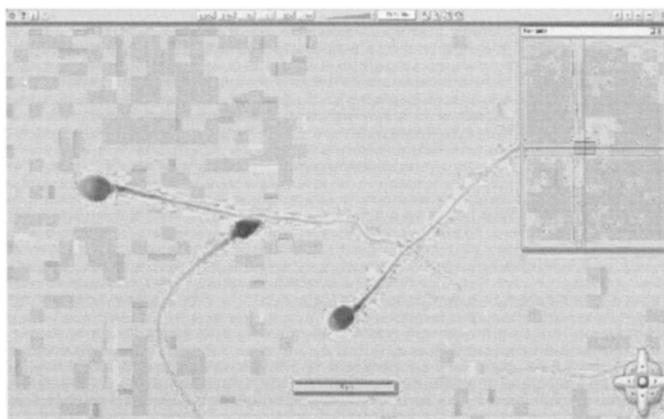


Figure 2 : Spermocytogramme virtuel. Aspect du « viewer » et des images obtenues par Internet. Les vues à différents grossissements peuvent être accessibles à partir de la barre supérieure, soit par pas d'objectifs soit par zoom. Une échelle mobile permet de préciser les dimensions des détails étudiés. L'image associée dans le coin de droite précise sur un faible grossissement la zone d'observation. On remarquera sur cette vue à haute définition la netteté des flagelles (Système EFI de correction de profondeur de champs).

sperme sont placés sur une cellule de Mackler et analysés à l'aide d'un microscope (Olympus BX 50) muni d'une platine chauffante, d'un système de contraste de phase fond noir et d'une caméra couleur (monture C - 2M pixels). Des séquences d'une minute sont numérisées, compressées et placées sur le site de spermionet. La visualisation des caractéristiques dynamiques est facile et accessible par les logiciels informatiques standards, sur une ligne ADSL haut débit classique.

III. RESULTATS

Le retour d'évaluation des documents transmis a été effectué auprès de 470 laboratoires français (dont 20 centres CECOS) et étrangers en les interrogeant soit sur un CQE, soit sur des dossiers de formation continue. Aucun d'entre eux ne nous a fait part de difficulté d'accès. La vision globale et l'approche à fort grossissement d'une zone définie (rendu final x1200) s'effectue rapidement et simule parfaitement le travail microscopique habituel, avec des pouvoirs séparateurs très fins (**Figure 2**).

Il a été demandé aux observateurs d'utiliser pour interpréter la lame virtuelle les grilles de codification de type David modifiée, précisées par Auger et Eustache en 2000 [1]. L'ensemble des laboratoires a pu rendre des résultats, ce qui témoigne de la faisabilité de la transmission par le net d'une telle préparation. Plusieurs internautes biologistes nous ont fait part de la qualité des documents ainsi fournis. Il est à remarquer que la qualité du matériel optique et informatique utilisé permet la visualisation de la pièce terminale des flagelles souvent difficile à préciser en routine (diamètre inférieur à 0,2 micron).

Le travail de codification a été utilisé sur les plus forts

grossissements pour des spermatozoïdes numérotés. Le dépouillement des résultats est en cours. Plusieurs observateurs nous ont adressés des remarques judicieuses sur les conclusions fournies par le comité de pilotage de spermionet (8 spécialistes en spermologie, représentants les associations scientifiques : SFBC, SALF, CECOS, BLEFCO et OMS) qui ont proposé des interprétations ciblées sur différentes atypies associées. Ce dialogue augure d'un véritable travail de collaboration nationale sur les codifications d'anomalies limites.

Pour les séquences de mobilité, la faisabilité a été également soulignée, malgré la particularité de la visualisation (gamètes brillants sur fond noir). Certains ont eu des problèmes de visualisation saccadée probablement en rapport avec le débit insuffisant momentané (avant chargement du fichier) de leur réseau.

IV. DISCUSSION

1. La formation en spermologie

La formation initiale théorique et pratique à la spermologie clinique n'est pas assurée dans la plupart des cursus des facultés françaises de médecine et de pharmacie. Les maîtrises de sciences biologiques et médicales MSBM qui comprenaient des certificats de Biologie et de Médecine de la reproduction de 100 heures de cours ont été supprimées au cours du passage en système LMD. Les unités M1 de Master qui les ont remplacées assurent des enseignements plus courts (30 heures), insuffisants pour une formation solide et plus tournés vers les activités de recherche fondamentale que vers la formation clinico-biologique. Seuls quelques Masters Pro récents sont proposés en France et principalement réservés aux futurs spécialistes de l'Assistance Médicale à la Procréation (AMP).

La formation secondaire doit être continue du fait de l'évolution constante des concepts de biologie de la reproduction et de l'AMP.

Le site spermionet (www.spermionet.com) permet par la toile une formation initiatique, des programmes de formation continue en spermologie (8 dossiers par an) élaborés par un comité de pilotage formé par des spécialistes des associations scientifiques (SFBC, CECOS, SALF, BLEFCO), proposés aux adhérents et accessibles par le Net.

Des documents complémentaires accompagnent ces formations : atlas d'anomalies, bibliographie ciblée, documents divers, lames virtuelles permettant l'étude de spermocytogrammes aux différents grossissements et l'interprétation des atypies sur chacun des spermatozoïdes, dans les corrigés. La précision des numérisations, rendue possible grâce au système EFI (Olympus) de mise au point de la profondeur de champs à chaque plage numérisée, permet de distinguer des détails inférieurs à 0,2 micron, comme la pièce finale du flagelle du spermatozoïde.

2. Les contrôles de qualité et la collaboration en ligne

Les contrôles de qualité (internes et externes) sont indissociables de cette formation continue. Les guides de bonne pratique et de recommandation demandent leur réalisation régulière au sein des laboratoires de spermologie

[4], sans véritablement donner de solution de faisabilité.

Le site spermionet est le seul site (et la seule possibilité actuelle en France) pour aborder le contrôle de qualité externe en spermologie.

La lecture par tous les adhérents d'une même préparation cytologique rend possible l'évaluation du contrôle de qualité externe. Cette précision ne pouvait être atteinte avec les autres techniques employées auparavant du fait de l'inhomogénéité des échantillons (pool de lames de spermocytogramme, envoi de paillettes congelées...). Il en est de même pour l'analyse des mobilités.

V. CONCLUSION

Le biologiste ne peut plus se passer de l'apport du Web pour sa formation.

Les particularités des différents temps de l'examen spermologique, la subjectivité des interprétations cytologiques statiques (spermocytogramme) et dynamiques (étude de mobilité) ont nécessité la mise au point de documents numérisés accessibles à tous les laboratoires par le Net : lame virtuelle et séquence vidéo de qualité.

Le site Spermionet met à disposition des laboratoires de spermologie, pour la première fois, un ensemble de moyens de formation, de contrôle, de collaboration et de dialogue avec ces nouveaux outils, qui permettra d'affiner le travail de codification entre experts, biologistes et techniciens.

REFERENCES

1. AUGER J., EUSTACHE F. : Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David. *Andrologie*, 2000, 10 : 358-373.
2. MASSONE C., PETER SOYER H., LOZZI G.P. et al : Feasibility and diagnostic agreement in teledermatopathology using a virtual slide system. *Hum. Pathol.*, 2007, 38 : 546-554.
3. SCHLOSSER J., NAKIBI I., CARRE-PIGEON F., STAERMAN F. : Stérilité masculine : définition et physiopathologie. *Ann. Urol. (Paris)*, 2007, 41 : 127-133.
4. WHO : Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction : World Health Organization. (fourth edition) Cambridge, Cambridge University Press, 1994.

*Manuscrit reçu : décembre 2007 ; accepté février 2008.
Communication XXIVème Congrès de la SALF, décembre 2007, Colmar.*

ABSTRACT

**Virtual analysis of sperm motility and morphology
External Quality Assessment and permanent education
on-line
The www.spermionet.com website**

**Bernard FOLIGUET, Jean Pascal SIEST, Hervé GAUTIER,
Catherine WURTZ, Thierry FORGES**

Semen analysis, especially estimation of sperm motility and morphology, is an important part of infertility investigation.

The “Biologie Prospective” Nancy-France website (www.spermionet.com) proposes modern tools for clinical pathologists designed to promote common clinical practice and teaching by Internet.

The aim of this study is describe these new techniques of on-line visualisation and diffusion for the study of human semen preparations.

The virtual slide allows external quality control of sperm cytology.

Video data of sperm motility are acquired by phase-contrast and dark field microscopy. The sequences are then compressed and published on line. The data have been evaluated by more than 480 laboratories.

These new tools allow multicentre studies and collaboration based on standardization of semen analysis.

***Key words:* human sperm, external quality assessment, virtual slide, motility**