

Analyse automatisée du spermocytogramme : la classification de David est toujours d'actualité !

André FORCE, Mélanie BADIOU et Benoît SCHUBERT

Laboratoire Biomnis, Centre AMP - clinique du Val d'Ouest Médicentre, 39 chemin de la Vernique 69130 Ecully - andre.force@biomnis.com

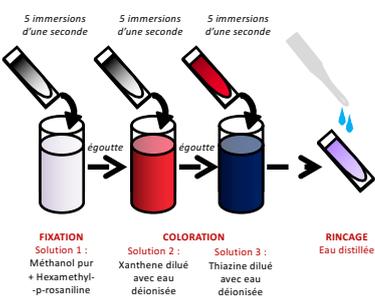
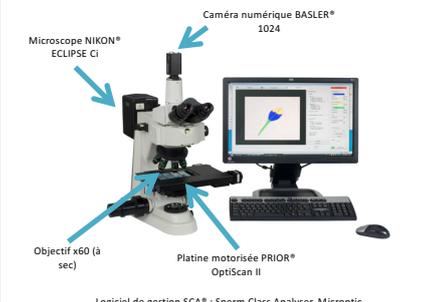
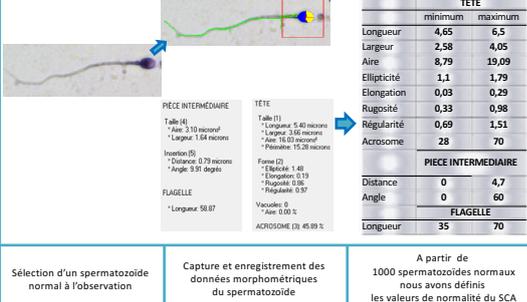
Introduction

L'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes, examen de 1^{ère} intention d'un sperme, est souvent discutée. En effet, de grandes variations inter-opérateurs et surtout inter-laboratoires, résultant de pratiques différentes, de classifications différentes et de techniques de coloration multiples empêchent une comparaison aisée des résultats. Par exemple, le programme d'Evaluation Externe de la Qualité (EEQ) de décembre 2015 par Biologie Prospective rapportait pour l'ensemble des laboratoires participant, des lectures de formes typiques (FT) pour un même échantillon de 0 à 52% (valeur de référence = 18,5%; 221 laboratoires participants) et pour un autre échantillon de 0 à 47% (valeur de référence=13,5%; 201 laboratoires participants) selon la classification de David modifiée!

Pour limiter ces variations, l'utilisation des systèmes d'analyses d'images de type CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) s'est développée mais les résultats n'ont pas toujours été à la hauteur des espoirs initiaux : résultats très discordants par rapport à l'analyse manuelle ou encore impossibilité de grader les spermatozoïdes selon la classification de David.

Nous présentons ici les résultats de notre travail pour adapter le système SCA (Sperm Class Analyser[®], Microptic) à la classification de David.

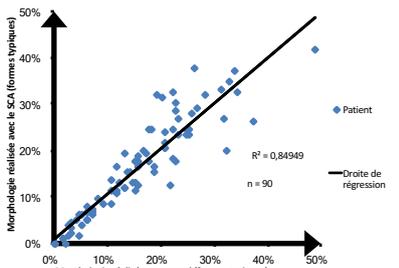
Matériels et méthodes / Résultats

Choix de la coloration	Capture et analyse des spermatozoïdes																																																				
Kit de coloration : Sperm Stain[®]  <p>FIXATION Solution 1 : Méthanol pur + Hexaméthyl-p-rosaniline</p> <p>COLORATION Solution 2 : Xanthène dilué avec eau déionisée</p> <p>RINÇAGE Eau distillée</p>	Méthode d'analyse  <p>Microscope NIKON[®] ECLIPSE CI</p> <p>Caméra numérique BASLER[®] 1024</p> <p>Objectif x60 (à sec)</p> <p>Platine motorisée PRIOR[®] OptiScan II</p> <p>Logiciel de gestion SCA[®] : Sperm Class Analyser, Microptic</p>	Paramétrage du logiciel  <p>Sélection d'un spermatozoïde normal à l'observation</p> <p>Capture et enregistrement des données morphométriques du spermatozoïde</p> <p>A partir de 1000 spermatozoïdes normaux nous avons définis les valeurs de normalité du SCA</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">TÊTE</th> </tr> <tr> <th></th> <th>minimum</th> <th>maximum</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Longueur</td> <td>4,65</td> <td>6,5</td> </tr> <tr> <td>Largeur</td> <td>2,58</td> <td>4,05</td> </tr> <tr> <td>Aire</td> <td>8,79</td> <td>19,09</td> </tr> <tr> <td>Ellipticité</td> <td>1,1</td> <td>1,79</td> </tr> <tr> <td>Elongation</td> <td>0,03</td> <td>0,29</td> </tr> <tr> <td>Rugosité</td> <td>0,33</td> <td>0,98</td> </tr> <tr> <td>Régularité</td> <td>0,69</td> <td>1,51</td> </tr> <tr> <td>Acrosome</td> <td>28</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">PIECE INTERMEDIAIRE</th> </tr> <tr> <th></th> <th>minimum</th> <th>maximum</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Distance</td> <td>0</td> <td>4,7</td> </tr> <tr> <td>Angle</td> <td>0</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">FLAGELLE</th> </tr> <tr> <th></th> <th>minimum</th> <th>maximum</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Longueur</td> <td>35</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table>	TÊTE				minimum	maximum	Longueur	4,65	6,5	Largeur	2,58	4,05	Aire	8,79	19,09	Ellipticité	1,1	1,79	Elongation	0,03	0,29	Rugosité	0,33	0,98	Régularité	0,69	1,51	Acrosome	28	70	PIECE INTERMEDIAIRE				minimum	maximum	Distance	0	4,7	Angle	0	60	FLAGELLE				minimum	maximum	Longueur	35	70
TÊTE																																																					
	minimum	maximum																																																			
Longueur	4,65	6,5																																																			
Largeur	2,58	4,05																																																			
Aire	8,79	19,09																																																			
Ellipticité	1,1	1,79																																																			
Elongation	0,03	0,29																																																			
Rugosité	0,33	0,98																																																			
Régularité	0,69	1,51																																																			
Acrosome	28	70																																																			
PIECE INTERMEDIAIRE																																																					
	minimum	maximum																																																			
Distance	0	4,7																																																			
Angle	0	60																																																			
FLAGELLE																																																					
	minimum	maximum																																																			
Longueur	35	70																																																			

Trois colorations, Papanicolaou modifié, Sperm Blue et Sperm Stain ont été testées. La coloration retenue est le Sperm Stain[®] pour 3 raisons :
 - frottis avec bruit de fond réduit
 - bonne différenciation des différentes structures morphologiques du spermatozoïde (meilleure caractérisation acrosome/noyau)
 - coloration rapide et reproductible.

La lame colorée est déposée sur la platine motorisée. L'analyse est effectuée sur 100 spermatozoïdes par le SCA en champ clair à l'objectif x60 à sec avec une caméra haute résolution à champ large qui permet la visualisation du flagelle.
 Après capture et analyse une vérification rapide des spermatozoïdes sélectionnés est effectuée par une technicienne qualifiée.

Sélection de 40 spermatozoïdes avec au moins 30% de formes typiques (évaluation en technique manuelle).
 Les spermatozoïdes jugés normaux à l'observation ont été analysés avec le SCA et leurs paramètres morphologiques enregistrés.
 L'analyse de 1000 spermatozoïdes normaux a permis de définir les intervalles de mesures d'un spermatozoïde normal : tête, pièce intermédiaire et flagelle.

Comparaison de méthode	Incertitude de mesure																
<p>- Etude comparative technique manuelle vs. automatique</p> <p>- 90 spermatozoïdes sur 3 niveaux de FT :</p> <ul style="list-style-type: none"> >20% de FT 10 à 20% de FT <10% de FT <p>- 30 spermatozoïdes par niveau</p>  <p>Figure 1. Comparaison de la technique manuelle avec le SCA sur 90 patients (valeurs extrêmes mesurées : 0 à 42% de spermatozoïdes de formes typiques).</p>	<p>Incertitudes calculées</p> <p>Exigence de performances</p> <p>Mode de calcul : $U(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$</p> <p>Pas de données de la littérature</p> <p>Incertitude résumée dans le tableau ci-joint</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Composante de l'incertitude</th> <th>Source de l'information</th> <th>Incertitude type</th> <th>Incertitude élargie (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Incertitude due à la dispersion intra labo (CIQ)</td> <td>Dispersion calculée à partir de la moyenne</td> <td>2,55</td> <td rowspan="2">8,76</td> </tr> <tr> <td>Ecart type EEQ</td> <td>3,38</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Incertitude liée à la justesse</td> <td>Ecart type EEQ</td> <td>3,38</td> <td rowspan="2">8,76</td> </tr> <tr> <td>Ecart moyen EEQ</td> <td>1,82</td> </tr> </tbody> </table> <p>Remarques technique en relation avec le calcul d'incertitude</p> <p>La lecture des lames au grossissement X60 sans huile permet leur relecture et facilite leur conservation. Ainsi on a pu mettre en place des Contrôles de Qualité Interne (CQI) hebdomadaires pendant 2 mois. De plus les lames des EEQ et des Echange Inter Laboratoire (EIL) de l'Association Rhônalpine des Biologistes de la Reproduction (ARBRE) peuvent être analysées par le SCA. A partir de l'analyse de ce CQI, de 3 EIL et de 2 EEQ, l'incertitude de mesure élargie pour l'analyse automatique a été calculée.</p>	Composante de l'incertitude	Source de l'information	Incertitude type	Incertitude élargie (%)	Incertitude due à la dispersion intra labo (CIQ)	Dispersion calculée à partir de la moyenne	2,55	8,76	Ecart type EEQ	3,38	Incertitude liée à la justesse	Ecart type EEQ	3,38	8,76	Ecart moyen EEQ	1,82
Composante de l'incertitude	Source de l'information	Incertitude type	Incertitude élargie (%)														
Incertitude due à la dispersion intra labo (CIQ)	Dispersion calculée à partir de la moyenne	2,55	8,76														
	Ecart type EEQ	3,38															
Incertitude liée à la justesse	Ecart type EEQ	3,38	8,76														
	Ecart moyen EEQ	1,82															

L'analyse automatique montre une forte corrélation avec la technique manuelle pour le paramètre de la morphologie ($R^2 = 0,84$ pour 90 spermatozoïdes analysés). La technique automatique est comparable à la technique manuelle pour le paramètre de la morphologie.

La technique automatique d'analyse de la morphologie des spermatozoïdes est bien adaptée aux contrôles de qualité exigés par la norme ISO 15189. La performance de la technique peut être suivie dans le temps, ce premier résultat d'incertitude élargie évalué à 8,76% sera à confirmer sur un temps plus long.

Discussion - Conclusion

Nous présentons ici une analyse automatisée du spermocytogramme adaptée à la classification de David, la plus largement utilisée en France, avec l'établissement d'intervalles de mesures d'un spermatozoïde normal (11 paramètres de caractérisation) adaptés au SCA[®] (Microptic). Notre étude montre que la technique d'analyse automatique est fortement corrélée à la technique manuelle.

Cette technique peut donc être déployée dans les laboratoires avec confiance, elle est compatible avec l'ensemble des programmes de contrôle de qualité. Elle est actuellement en cours d'accréditation. L'index d'anomalies multiples qui n'est pas présenté dans cette étude peut également être calculé par le logiciel.

La classification de David modifiée est ainsi conservée au laboratoire, sans modifier nos critères d'interprétation, évitant l'apprentissage d'une nouvelle classification à nos prescripteurs et nous permettant aussi de mieux suivre l'évolution de nos patients dans le temps.

A notre connaissance, c'est la 1^{ère} analyse automatisée adaptée à la classification de David modifiée.

Références: David G et al. Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. Proposition pour un système de classification. J Gynecol Obst Biol Reprod 1975;4(Suppl):37-86. Auger et al. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. Hum Reprod 2001; 16:2710-7. Auger et al. Another look at human sperm morphology. Hum Reprod, 2016; 31:10-23.