

L'analyse automatisée de la morphologie du spermatozoïde

D. LE LANNOU

Unité de Biologie de la reproduction, CECOS, CHR Hotel-Dieu, 1, bis rue de la Cochardière, 35000 Rennes

RESUME

L'Analyse morphologique du spermatozoïde humain est un des éléments d'évaluation de son pouvoir fécondant, mais peut aussi permettre par l'étude des formes anormales une approche du fonctionnement testiculaire. La littérature met en évidence une très grande variabilité dans les résultats observés, en relation avec des méthodologies différentes, une grande diversité des classifications proposées et une grande subjectivité dans l'interprétation de cette morphologie.

L'analyse automatisée de la morphologie spermatique permet une mesure objective des différents paramètres morphométriques du spermatozoïde. Une standardisation des méthodes est nécessaire. L'analyse de la tête spermatique semble la plus accessible à l'analyse automatisée et devrait pouvoir apporter des éléments sélectifs dans l'évaluation de la fertilité, associée à l'analyse automatisée du mouvement.

Par contre l'analyse automatisée des anomalies spermatiques paraît illusoire avec les systèmes actuels, la pièce intermédiaire et le flagelle étant de petites structures peu colorées et difficilement identifiables par l'ordinateur. De plus un consensus doit d'abord être recherché sur la définition des critères et des classes de spermatozoïdes anormaux.

Mots clés : Spermatozoïde ; Morphologie, Analyse automatisée.

INTRODUCTION

L'analyse morphologique du spermatozoïde humain est une étape importante du spermogramme. Les études cliniques ont bien montré que, à l'inverse de la mobilité et de la numération, la morphologie spermatique est un des paramètres spermatiques les plus stables pour un sujet donné. C'est aussi le paramètre le mieux corrélé à la fertilité.

Cependant l'analyse de la morphologie des spermatozoïdes a été et continue d'être très difficile et sujet à de nombreuses controverses, et ceci pour plusieurs raisons :

- il n'existe aucune définition objective du spermatozoïde fonctionnellement normal ; en effet un spermatozoïde morphologiquement normal peut être dysfonctionnel pour d'autres raisons, et inversement un sperme morphologiquement anormal peut être fécondant, en particulier dans le contexte des AMP.
- les nombreux auteurs qui se sont intéressés à ce sujet ont souvent proposé leur propre méthode d'analyse, et on peut dire aujourd'hui qu'il y a autant de classifications des anomalies spermatiques qu'il y a d'auteurs.

- le caractère subjectif de l'analyse morphologique est à l'origine de variations très importantes des résultats entre laboratoires, ou dans un même laboratoire entre observateurs [1, 4, 17].

INTERET ET LIMITES DE L'ANALYSE VISUELLE

Les informations fournies par l'étude de la morphologie du spermatozoïde sont de deux ordres :

- soit évaluer le pouvoir fécondant du spermatozoïde. Il s'agit alors d'étudier le spermatozoïde normal dans l'éjaculat, mais dans l'idée de son interaction avec l'ovocyte. C'est une démarche pronostique d'évaluation de la fertilité de l'homme.
- soit rechercher l'origine de l'anomalie du sperme observée : il s'agit alors d'une démarche diagnostique, consistant à analyser les anomalies morphologiques dont l'origine serait testiculaire.

1. Morphologie spermatique et fonction spermatique (fertilité)

Les premières études ont mis en évidence la relation entre la morphologie et la fertilité. Ainsi McLeod en 1951 [14] a montré que le pourcentage d'anomalies morphologiques était plus élevé dans les populations d'hommes infertiles que dans celles d'hommes fertiles. Depuis plusieurs auteurs ont confirmé cette corrélation entre fertilité et morphologie [8, 10, 15].

Cette approche de la fertilité nécessite la **définition du spermatozoïde normal et fécondant**.

Un spermatozoïde normal est considéré classiquement comme ayant une tête de forme ovale, régulière, une pièce intermédiaire rectiligne, un flagelle fin et souple. Cette définition simple est cependant sujette à de nombreuses interprétations : dans une étude comparant les résultats de

plusieurs laboratoires d'AMP utilisant la classification de David, nous avons montré que le coefficient de variation du pourcentage de formes normales était d'environ 30% [7]. De nombreux auteurs ont également observé des coefficients de variation de 25 à 40% entre observateurs, quelle que soit la classification utilisée [4, 17]. En fait les divergences proviennent de la plus ou moins grande acceptation des formes limites, dites "borderline". Un changement notable dans la classification des spermatozoïdes normaux a été l'introduction des critères stricts de Kruger. Dans cette classification toutes les formes "borderline" sont classées en "anormales". Avec ces critères stricts le pourcentage de formes normales dans une population d'hommes fertiles est descendu à 14-15% [10], par rapport au 30-50% des méthodes classiques. Ceci pourrait être une approche intéressante, mais qui doit être tempérée par le fait que, d'une part le coefficient de variation interlaboratoires utilisant cette même méthode reste toujours élevé [4], d'autre part il existe déjà au moins trois méthodes de classification de Kruger [10, 11, 15]

2. Morphologie spermatique et fonction testiculaire (infertilité)

S'il est difficile de trouver un consensus sur la définition d'un sperme normal, que dire alors des formes anormales. Le grand nombre d'anomalies observées de la tête, de la pièce intermédiaire ou du flagelle, auxquelles se surajoutent les formes associées, rendent les résultats d'un laboratoire à l'autre difficilement comparables. Le faible pourcentage de chaque anomalie entraîne un coefficient de variation pouvant être très élevé de 60 à 80%, [17]. L'introduction de l'index anomalies multiples [8], prenant en compte les formes associées, a permis de réduire de manière importante les variations entre laboratoires, mais au prix d'une perte d'information.

Outre ces problèmes de méthodologie, l'étude des formes anormales pose aussi la question de leur interprétation physiopathologique. Les anomalies morphologiques sont d'origine testiculaire, apparaissant lors de la spermiogénèse. Elle sont donc le reflet du (dys)fonctionnement testiculaire, et pourraient être un indicateur de l'étiologie de cette dysfonction. Les agressions telles que l'hyperthermie, la chaleur ou certains toxiques sont responsables d'une augmentation des formes anormales. Malheureusement à ce jour aucune étude clinique n'a pu mettre en évidence un profil morphologique spécifique d'une affection donnée. Le "stress syndrome" décrit par McLeod peut s'observer dans de nombreuses circonstances, et non seulement dans le varicocèle comme il l'avait suggéré initialement.

Et cette ignorance dans lequel nous sommes de la signification des formes anormales, hormis le fait qu'elles diminuent le pouvoir fécondant du sperme, relativise actuellement l'importance de ces études morphologiques en tant qu'indicateur de la fonction testiculaire.

L'ANALYSE AUTOMATISEE

L'Analyse automatisée de la morphologie spermatique paraît pour les raisons énumérées ci-dessus une approche intéressante, supprimant le caractère subjectif de la mesure, et donc réduisant les erreurs d'interprétation.

Il existe actuellement plusieurs publications concernant les systèmes automatisés. Le système ASMA (Automated sperm morphology analysis) se compose d'un microscope, d'une camera video et d'un microordinateur. L'image video est mémorisée par l'ordinateur qui va ensuite appliquer ses algorithmes de reconnaissance des contours et des formes lui permettant de reconnaître puis d'analyser la cellule. Un certain nombre de paramètres morphométriques, tels que longueur, largeur, surface, périmètre,

régularité du contour, densité de la cellule sont fournis par le ASMA et servent de base à la classification.

L'Analyse automatisée doit permettre une mesure objective, reproductible et donc comparable d'un laboratoire à l'autre. Plusieurs études ont montré que la morphométrie des spermatozoïdes pouvait varier en fonction de la préparation des lames et des colorations [3, 9]. La première étape vers une uniformisation des systèmes de classification est donc la standardisation des méthodes de préparation.

Les systèmes automatisés permettent une mesure objective et précise, notion que confirment les très faibles coefficients de variation observés pour les données morphométriques brutes [2, 13,18].

Cependant pour être exploitables, ces données morphométriques doivent être utilisées comme critères de définition des différentes classes de spermatozoïdes normaux et anormaux. Et le nombre de paramètres retenus comme critères d'une classe donnée va fortement influencer les résultats.

Ainsi par exemple, pour définir une tête spermatique "normale", tous les auteurs retiennent au moins 3 valeurs morphométriques : Longueur, largeur et rapport L/l. Ces critères sont simples mais déjà à ce niveau il existe de grandes divergences entre auteurs, (Tableau 1), et de petites différences dans les seuils de mesures d'acceptation d'un spermatozoïde normal vont entraîner de très grandes variations de l'ordre de 100% dans le résultat final du pourcentage de formes normales.

D'autres auteurs ont pris en compte des paramètres supplémentaires. Ainsi le système Fertech SMA [12, 13] apprécie la régularité du contour de la tête, en l'assimilant dans un modèle mathématique à une ellipse régulière, ainsi que la présence de l'acroosome, qui doit représenter 40% de la surface de la tête, en évaluant les différences de densité. Avec un tel système, l'erreur d'ap-

Tableau 1: Critères morphométriques de la tête spermatique proposés dans 4 méthodes

METHODE	Longueur L (μ)	largeur l (μ)	Rapport
WHO PAP (1987)	3.0-5.0	2.0-3.0	$L/2 < l < 2L/3$
WHO PAP (1992)	4.0-5.5	2.5-3.5	$4L/7 \leq l \leq 2L/3$
KRUGER PAP (1991)	3.0-5.0	2.0-3.0	$3L/5 \leq l \leq 2L/3$
KRUGER Diffquik (1991)	5.0-6.0	2.5-3.5	$3L/5 \leq l \leq 2L/3$

préciation d'un sperme normal chute à 10% par rapport à l'observation manuelle. La reproductibilité est satisfaisante et le temps d'analyse est d'environ 10mn pour 100 spermatozoïdes. Kruger et Menkveld [13] ont montré une bonne corrélation entre les résultats de cette analyse et la fertilité.

Garret et Baker [5] ont développé un logiciel très complet qui permet de recueillir 21 paramètres de surface et 8 paramètres de densité. Ce système permet une très bonne interprétation des images de la tête spermatique, ainsi que de la région du col et de la pièce intermédiaire. Ce système donne d'excellentes corrélations avec l'observation manuelle (95%), mais la précision de l'analyse nécessite un temps de calcul important : il faut environ 100 mn pour analyser 100 spermatozoïdes.

Comparant des spermatozoïdes dans l'éjaculat et ceux qui se sont fixés à la Zone Pellucide, ces auteurs ont pu identifier quelques paramètres prédictifs de la fixation à la ZP : tête avec une large région antérieure de faible densité optique, importante symétrie axiale de la tête, minimum d'anomalies du col. [6] Ces résultats mettent donc l'accent sur la différence de coloration et la symétrie ellipsoïdale de la région antérieure de la tête, qui est la région acrosomique. Une récente étude confirme ces résultats, montrant que la morphologie de l'acrosome est supérieure en valeur prédictive de succès de la FIV à la morphologie du spermatozoïde [16].

Il est évident qu'en fournissant suffisamment de paramètres morphométriques, un ASMA peut être programmé pour identifier les spermatozoïdes suivant n'importe quelle classification déjà existante. Cependant l'intérêt et l'objectivité de l'ASMA sont perdus si les résultats bruts de l'appareil ne sont utilisés que pour attribuer avec précision un spermatozoïde à une classification subjective. Il est probablement nécessaire de raisonner différemment avec un ASMA et les récents résultats de Garrett et de Menkveld pourraient servir de base à une nouvelle classification.

En pratique toutes les études montrent qu'il est très difficile aujourd'hui de définir un spermatozoïde normal : dans l'évaluation de la fertilité, l'analyse de la tête du spermatozoïde avec une évaluation très précise de la région acrosomique semble primordiale, et seront considérés comme normaux et potentiellement féconds les spz répondant à ces critères.

Il est à noter que dans les systèmes publiés actuellement, seule la tête du spermatozoïde est prise en considération. La pièce intermédiaire et le flagelle sont des structures de petite taille, faiblement colorées, et leur identification par l'analyseur est difficile et responsable de nombreuses erreurs de détermination du contour. Dans l'idée d'une évaluation de la fertilité ces analyses de la pièce intermédiaire et du flagelle sont-elles nécessaires ? Certes l'intégrité de l'appareil flagellaire est indispensable à la fécondation mais l'analyse de la mobilité par les CASMA (Computer Automated

Sperm Motion Analysis) fournira surement des informations plus précises sur la valeur fonctionnelle de l'appareil locomoteur du spermatozoïde.

La réponse apportée serait certainement différente si l'analyse de la morphologie n'avait pas seulement pour but d'évaluer le pouvoir fécondant des spermatozoïdes, mais aussi d'étudier les troubles de la spermatogénèse. Dans ce cas il est évident que *a priori* toutes les anomalies sont importantes. Dans une telle approche, l'identification d'une anomalie nécessite la prise en compte de beaucoup plus de critères morphométriques concernant la tête mais aussi la pièce intermédiaire et le flagelle. Cette seconde démarche est donc très différente de la précédente et nécessite une analyse très fine de tous les constituants du spermatozoïde. Il est évident qu'une telle analyse très complexe n'est utile que si l'on sait ce que l'on cherche. Or à ce jour les interprétations physiopathologiques des anomalies spermatiques sont quasi inexistantes. De nouvelles études sur la signification des anomalies observées sont donc indispensables avant d'envisager une analyse automatisée de ces anomalies.

CONCLUSIONS

L'extrême variabilité observée dans l'interprétation de la morphologie des spermatozoïdes dans les laboratoires d'Andrologie diminue grandement l'intérêt de cet examen, alors que les études cliniques ont clairement démontré son intérêt en particulier dans l'évaluation de la fertilité. L'Analyse automatisée de la Morphologie Spermatique pourrait résoudre ce problème, en apportant des mesures objectives et reproductibles. Cependant une standardisation de la préparation des lames est indispensable. Un consensus sur les critères sélectifs retenus pour identifier un spermatozoïde normal ou anormal devra ensuite être recherché, en s'appuyant sur l'expérience clinique.

REFERENCES

1. COOPER T.G., NEUWINGER J., BAHRS S., NIESCHLAG E. : Internal quality control of semen analysis. *Fertil.Steril.*, 1992, 58, 172-178.
2. DAVIS R.O., BAIN DE., SIEMERS RJ. : Accuracy and precision of the Cellform -Human automated sperm morphometry instrument. *Fertil. Steril.*, 1992, 58, 763-769.
3. DAVIS R.O. AND GRAVANCE C.G. : Standardisation of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertil. Steril.*, 1993, 59, 412-417.
4. DAVIS R.O., GRAVANCE C.G. AND OVERSTREET J.W. : A standardized test for visual analysis of human sperm morphology. *Fertil.Steril.*, 1995, 63, 1058-1063.
5. GARRETT C. AND BAKER H.W.G. : A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertil. Steril.*, 1995, 63, 1306-1317
6. GARRETT C., LUI D.Y. AND BAKER H.W.G. : Selectivity of the human sperm-zona pellucida binding process to sperm head morphometry. *Fertil. Steril.*, 1997, 67, 362-371
7. HERLICOVIEZ D. ET GROUPE PÉRICONCEPTOLOGIE DE L'OUEST. Pour une harmonisation de la lecture des spermocytogrammes. *Contrac.Fertil.Sexual.*, 1993, 21, 416.
8. JOUANNET P., DUCOT B., FENEUX D., SPIRA A. : Male factor and the likelihood of pregnancy in infertile men. I. Study of sperm characteristics. *Int. J. Androl.*, 1988, 11, 379-394.
9. KATZ DF, OVERSTREET JW, SAMUELS SJ ET AL : Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male infertility. *J.Androl.*, 1986, 7, 203-210.
10. KRUGER TF, MENKVELD R, STANDER FS, LOMBARD CJ, VAN DER MERWE JP, VAN ZYL JA, ET AL : Sperm morphologic features as a pronostic factor in in vitro fertilization. *Fertil.Steril.*, 1986, 46, 1118-1123.
11. KRUGER TF, ACOSTA AA, SIMMONS KF, SWANSON RJ, MATTA JF, OEHNINGER S. : Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil.Steril.*, 1988, 49, 112-117.
12. KRUGER TF, DU TOIT TC, FRANKEN DR, ACOSTA AA, OEHNINGER SC, MENKVELD R, LOMBARD CJ. : A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as technician reading. *Fertil. Steril.*, 1993, 59, 202-209.
13. KRUGER TF, DU TOIT TC, FRANKEN DR, MENKVELD R, LOMBARD CJ. : Sperm morphology : assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyser IVOS. *Fertil. Steril.*, 1995, 63, 134-141.

14. MACLEOD J, GOLD RZ. : The male factor in fertility and infertility. Sperm morphology in fertile and infertile marriage. *Fertil Steril.*, 1951, 2, 394-414.
15. MENKVELD R, STANDER F, KOTZE TJ, KRUGER TF AND VAN ZYL JA. : The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to strict criteria. *Human Reprod.*, 1990, 5, 586-592.
16. MENKVELD R, RHEMREV JPT., FRANKEN DR, VERMEIDEN JPW AND KRUGER TF. : Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro. *Fertil. Steril.*, 1996, 65, 637-644.
17. NEUWINGER J, BEHRE HM, NIESCHLAG E. External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil.Steril.*, 1990, 54, 308-314
18. WANG C, LEUNG A, TSOI WL, LEUNG J, NG V, LEE KF, CHAN ST. : Computer-assisted assessment of human sperm morphology: comparison with visual assessment. *fertil.Steril.*, 1991, 55, 983-988.

ABSTRACT

Automated sperm morphology

D. LE LANNOU

Examination of sperm morphology is one factor of evaluation of sperm function, but it can also be considered as a biomarker of testicular function. All publications showed a high variability in observed results, in relation with different methods of staining slides

and classifying sperm morphology, and a large subjectivity in the visual assessment.

Automated sperm morphology analysis (ASMA) have the potential to provide more objective, accurate, and precise morphometric measurements of spermatozoa. Standardisation of the methods of slides preparation is first essential. Analysis of the sperm head morphometry appears the more accessible for the ASMA and could give selective parameters in the evaluation of fertility, in complement with motion sperm analysis.

In the other hand automated analysis of all sperm abnormalities appears illusory with actual instruments, because the midpiece or the flagellum is a little structure weakly stained, and thus difficult to be identified by the computer. Until more rigorous and consistent definitions of sperm features can be developed, in relation with testicular function, the pronostic value of existing sperm abnormalities classifications is limited.

Key words : Sperm morphometry, computer analysis.