

Sommaire

scientifique

VOLUME 16 • NUMÉRO 2 • FÉVRIER 2009

LE SPERMOGRAMME



Présentation de l'auteur

Madame Johanne Dussault a obtenu son diplôme en technologie de laboratoire médical au Cégep de Sherbrooke. Madame Dussault travaille en tant que technologiste médicale au Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke depuis 1986. Ayant travaillé dans le laboratoire de biochimie, d'hématologie, et au laboratoire de banque de sang, elle est maintenant coordonnatrice technique au laboratoire de pathologie. En 1989, elle a participé à la mise au point des techniques de lavage de sperme, à l'élaboration d'un spermogramme plus complet et à la création du laboratoire de fertilité.

Introduction

Le spermogramme est un examen essentiel à la recherche de la cause de l'infertilité au sein d'un couple. Les renseignements qu'il fournit se doivent d'être justes et représentatifs de l'échantillon obtenu. L'échantillon de sperme est soumis à différentes analyses ayant pour but de le quantifier et d'en évaluer la qualité des spermatozoïdes. Un examen post-vasectomie peut également être effectué pour vérifier le succès de cette intervention. Au Québec, ces examens sont effectués tant par des technologues médicaux exerçant en biologie médicale ou en cytopathologie que par des cytologistes; les rapports produits par les laboratoires biomédicaux varient selon l'établissement et ne sont donc pas uniformes.

Toutes les procédures nécessaires aux diverses étapes d'exécution d'un spermogramme ainsi que l'examen post-vasectomie vous seront présentés, tels qu'ils sont effectués au laboratoire de pathologie du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke. Fruit de plusieurs

recherches, cet article est principalement basé sur les critères de l'OMS¹ (Organisation mondiale de la Santé).

Accueil du patient

À l'accueil du patient, certains détails doivent être vérifiés tels que :

- S'assurer que l'échantillon est bien identifié;
- Vérifier si la collecte de l'échantillon de sperme a été effectuée à l'hôpital ou au domicile (l'échantillon doit être maintenu à la température du corps (37 °C) durant le transport jusqu'au laboratoire);
- Inscrire la date et l'heure de la réception de l'échantillon (si l'échantillon a été prélevé au domicile, le patient doit se rendre dans l'heure suivant l'éjaculation);
- Le spécimen doit être recueilli après un minimum de quarante-huit heures d'abstinence sans toutefois dépasser 7 jours.

Le spermogramme selon l'OMS (Organisation mondiale de la Santé)

Le spermogramme permet d'évaluer la quantité et la qualité des spermatozoïdes. Voici les critères de classification de l'OMS d'un spermogramme dit « normal » :

Critères de l'OMS	
Volume	2,0 ml ou plus
pH	7,2 ou plus
Numération des spermatozoïdes	20 x 10 ⁶ /l ou plus
Concentration totale des spermatozoïdes	40 x 10 ⁶ spermatozoïdes ou plus par éjaculation
Mobilité	50 % ou plus de spermatozoïdes mobiles (avec progression vers l'avant) (grade A+B) ou 25 % ou plus de spermatozoïdes mobiles avec une progression linéaire rapide (A) dans les 60 minutes qui suivent l'éjaculation
Morphologie	15 % ou plus de spermatozoïdes à morphologie normale
Viabilité	50 % ou plus de spermatozoïdes viables (ne prenant pas la couleur)
Leucocytes	Moins de 1 x 10 ⁶ /l

Abstract

This article describes the importance of standardization in the evaluation of spermatozoa for fertility and post-vasectomy purposes, as it is being done in the CHUS (Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke) in the province of Quebec. The evaluation of the parameters is based on the World Health Organisation criteria. Different aspects of semen analysis are discussed, such as enumeration of spermatozoa, viability, Kruger classification and interpretation of results. An introduction to newer techniques such as Computer Assisted Semen Analysis (CASA) and DNA fragmentation are also discussed.

Évaluation dans le cadre du spermogramme

La liquéfaction

Avant de commencer l'analyse du sperme, une période de temps doit être accordée pour la liquéfaction. La durée normale de liquéfaction est de 30 minutes. Si celle-ci n'est pas réalisée à l'intérieur de ce délai, on dira qu'elle est lente plutôt que normale.

Le volume

À l'aide d'une pipette ou d'un cylindre gradué, le volume de l'éjaculat est mesuré.

La viscosité

Celle-ci s'évalue selon 4 niveaux à l'aide d'une pipette :

Viscosité normale : si l'échantillon se sépare bien goutte à goutte;

Viscosité 1 : si l'échantillon forme un filet liquide entre chaque goutte;

Viscosité 2 : si l'échantillon est suffisamment visqueux pour que le filet soit continu;

Viscosité 3 : si l'échantillon est tellement visqueux qu'il ne peut s'écouler par la pipette.

Le pH

Celui-ci est mesuré à l'aide de papier pH.

La mobilité

Pour évaluer la mobilité, un examen à l'état frais doit être effectué : placer 10 microlitres (μL) de sperme entre une lame et une lamelle. Un décompte est réalisé en visualisant au moins 200 spermatozoïdes (2×100) et l'évaluation des grades se fait comme suit :

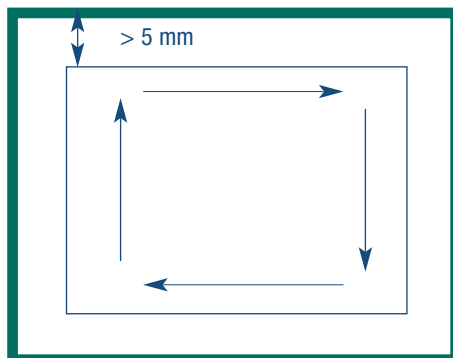
Grade A : progression rapide : les spermatozoïdes bougent bien en ligne droite à travers le champ du microscope;

Grade B : progression lente : les spermatozoïdes bougent lentement, en zigzaguant;

Grade C : agitation sans progression : les spermatozoïdes bougent mais n'avancent pas (seules les flagelles bougent);

Grade D : immobiles : les spermatozoïdes sont complètement immobiles.

Note : il est préférable d'effectuer la lecture à plus de 5 mm du rebord de la lamelle :



La viabilité - Coloration Éosine-Nigrosine

Cette coloration est basée sur le principe de la perméabilité des cellules mortes à certains colorants comme l'éosine (membranes plasmiques lésées).

Celle-ci nous permet d'évaluer, en faisant un décompte de 200 spermatozoïdes, le pourcentage de spermatozoïdes vivants.

Ceux en blanc ont une membrane qui n'est pas lésée, c'est-à-dire qu'ils résistent à la coloration à l'éosine, tandis que ceux en rouge ont une membrane lésée permettant à l'éosine de pénétrer à l'intérieur de la cellule. Quant à la nigrosine, elle sert seulement à colorer le fond du frottis.

De plus, ce test nous donne l'occasion de faire un contrôle interne en ce qui a trait à l'estimation de la mobilité.

La technique

- Ajouter 2 gouttes de sperme.
- Ajouter 2 gouttes de solution aqueuse à l'éosine 1 %, bien mélanger au vortex.
- Attendre 30 secondes.
- Ajouter 2 gouttes de solution aqueuse à la nigrosine 10 %, bien mélanger au vortex.
- Déposer une goutte entre une lame et une lamelle.
- Faire un décompte de 200 spermatozoïdes à 40 X.



Source : Atlas of Sperm Morphology⁶

La numération

Cette étape permet de déterminer la concentration de spermatozoïdes dans l'éjaculat à analyser. Les résultats s'expriment en milliard/L (SI).

Voici un tableau pouvant nous aider à choisir la bonne dilution pour effectuer la numération :

Type d'échantillons	Dilution	Volume de diluant	Volume de sperme	Facteur ajustement
Oligospermie sévère	-----	-----	Goutte éch. pure	$N^{bre*}/20$
Oligospermie	1/10	180 ul	20 ul	$N^{bre}/2$
Normal	1/20	190 ul	10 ul	N^{bre}
Décompte élevé (donneur)	1/40	390 ul	10 ul	$N^{bre} \times 2$
		195 ul	5 ul	

* N^{bre} : nombre de spermatozoïdes comptés dans les 5 carrés de l'hématimètre (4 coins + centre). Les résultats s'expriment en milliard de spermatozoïdes/L.

La procédure de numération

Cette procédure est proposée à titre d'exemple :

- Avec une dilution de 1 sur 20 (10 µL de sperme avec 190 µL de liquide immobilisant), on compte en examinant les 4 coins + le centre du carré E (voir le schéma de l'hématimètre);
- Étaler la dilution sur un hématimètre des 2 côtés et laisser reposer dans une chambre humide (boîte de Pétri) 10 minutes avant d'en faire la lecture;
- Le nombre de spermatozoïdes comptés X 1 000 000 nous donne directement le nombre en milliard par litre (voir la formule).

Hématimètre

A				B				C			
D				E				F			
G				H				I			

La formule applicable à la numération

$$N^{bre} \text{ de spermatozoïdes/L} = 1\,000X$$

$$\frac{N^{bre} \text{ de spermatozoïdes comptés} \times \text{dilution} \times 10}{N^{bre} \text{ de mm}^2 \text{ comptés}}$$

Par exemple, en utilisant une dilution de 1/20 et en comptant les spermatozoïdes observés dans les 4 coins et au centre du carré E (voir tableau ci-dessus), le facteur de multiplication est de 1 000 000.

$$N^{bre} \text{ de spermatozoïdes/L} = 1\,000X$$

$$\frac{N^{bre} \text{ de spermatozoïdes comptés} \times 20 \times 10}{1/5 \text{ mm}^2}$$

Le liquide utilisé pour la numération manuelle

Pour effectuer une numération, on utilise un liquide immobilisant les spermatozoïdes. En voici quelques exemples :

- Liquide maison :
15 g de bicarbonate de sodium
3 g de phénol
300 ml d'eau distillée
- Liquide de Dacie :
10 ml de formol à 40 %
990 ml de citrate de sodium à 3 %
- Eau très froide

La morphologie

La morphologie des spermatozoïdes est évaluée après coloration d'un frottis et examen de celui-ci au microscope.

- Faire un frottis sur une lame chargée positivement (évite le décollement et la contamination);
- Autant que possible, une normalisation de la quantité de sperme utilisée est préférable pour faire le frottis : 10 µL de sperme étalé en frottis et fixé au « cytospray »;
- Différentes colorations peuvent être utilisées, en voici quelques exemples : Hématoxyline et Éosine, Papanicolaou ou Diff-Quick;
- Un décompte d'au moins 200 spermatozoïdes est effectué avant d'établir une moyenne. Les résultats sont exprimés en pourcentage (%).

La classification de Kruger

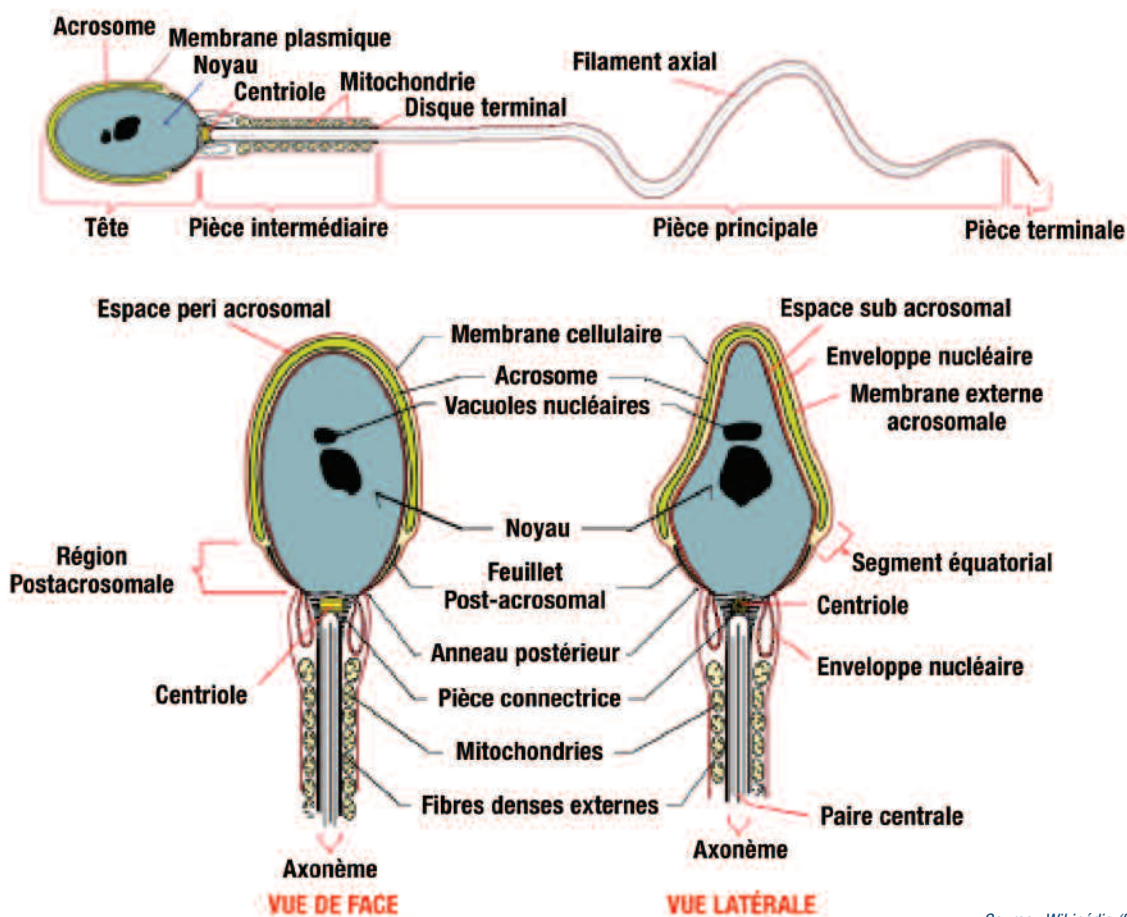
(La classification stricte de Kruger est recommandée par l'Organisation mondiale de la Santé)

La classification de Kruger recense une seule anomalie par spermatozoïde. L'anomalie est recensée par ordre d'importance comme suit :

- ACROSOME
- TÊTE
- PIÈCE INTERMÉDIAIRE
- FLAGELLE

Aussitôt qu'une anomalie est recensée, le spermatozoïde est directement classé dans les « anormaux ». Les évaluations de la morphologie selon Kruger sont beaucoup plus strictes; on parle

Illustration des parties constituantes d'un spermatozoïde humain :



Source : Wikipédia (fr.wikipedia.org)

de morphologie normale à partir de 15 % lors d'évaluation de la morphologie sur frottis coloré.

Bien que la classification des spermatozoïdes « normaux » comparativement à « anormaux » prime, nous pouvons, si l'on veut, détailler les anomalies, par exemple :

- 22 % de spermatozoïdes normaux
- 12 % d'acrosomes absents
- 5 % de têtes allongées
- 17 % de microcéphales
- 29 % de têtes amorphes
- 3 % de reste cytoplasmique
- 12 % de flagelles enroulés

Total : 100 %

S'il y a une prédominance d'une anomalie en particulier, il est important de la noter. Par exemple, on peut noter une prédominance de spermatozoïdes à têtes rondes (sans acrosome); voir l'image plus loin « morphologie anomalie acrosomale, image no 6 »

Les principales anomalies recensées sont les suivantes :

ANOMALIES DE LA TÊTE :

Acrosome anormal, absent, vacuolé

Tête allongée, amincie, microcéphale, macrocéphale multiple

ANOMALIES DE LA PIÈCE INTERMÉDIAIRE :

Reste cytoplasmique (extrusion)

Pièce grêle

Pièce angulée

ANOMALIES DU FLAGELLE :

Absent

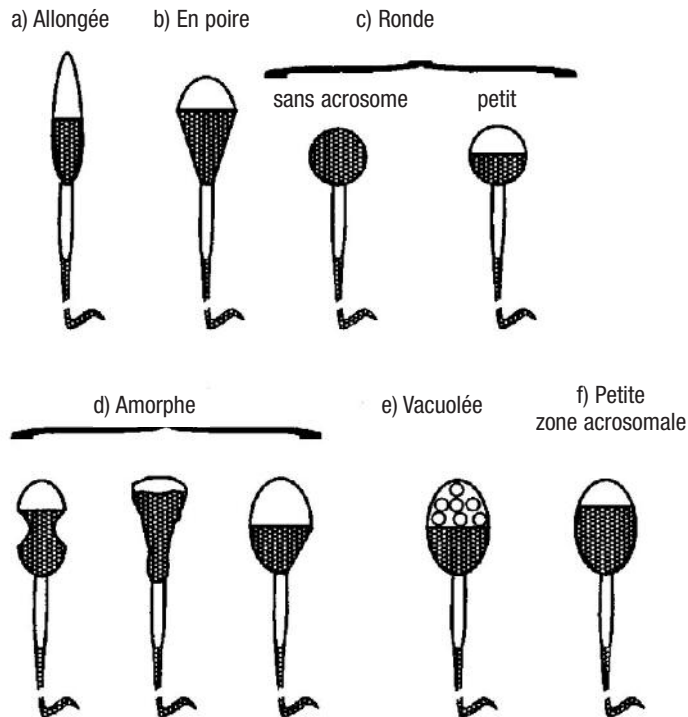
Écourté

De calibre irrégulier

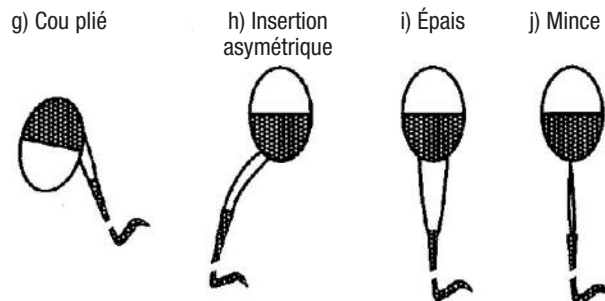
Enroulé

Multiple

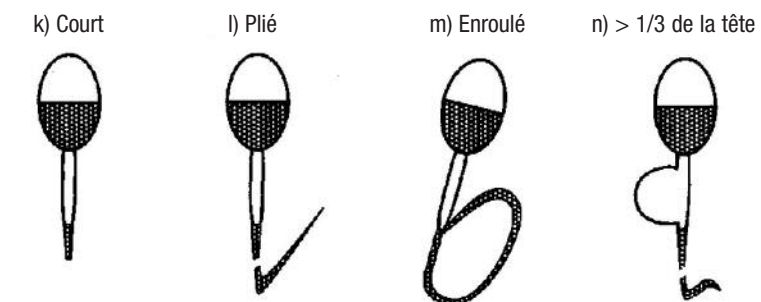
A. Défauts de la tête



B. Défauts du cou et de la pièce intermédiaire



C. Défauts du flagelle



D. Extrusion cytoplasmique

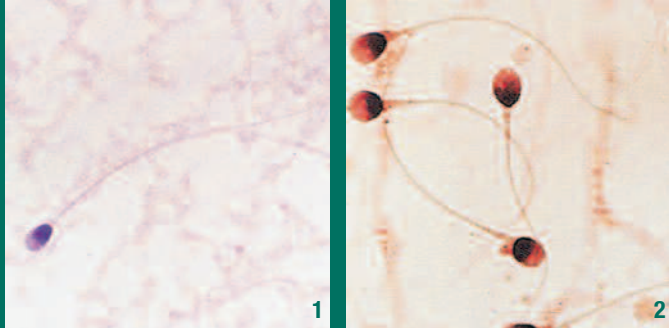
n) > 1/3 de la tête



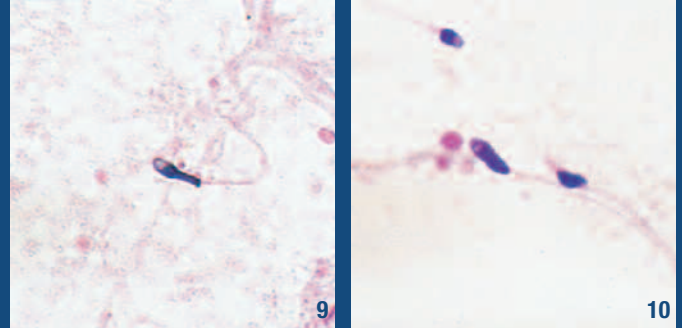
Source : WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Traduction libre

Les images suivantes démontrent la morphologie normalement retrouvée ainsi que différentes anomalies morphologiques qui peuvent être présentes :

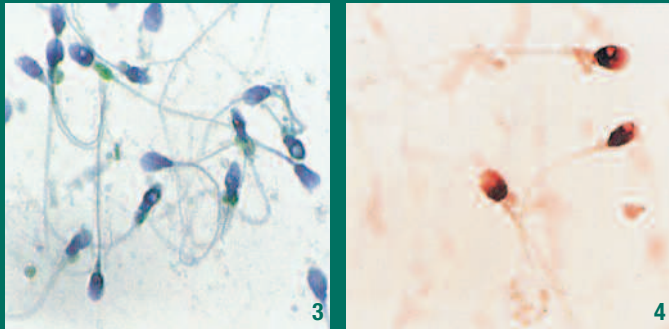
MORPHOLOGIE SPERMATOZOÏDES NORMAUX



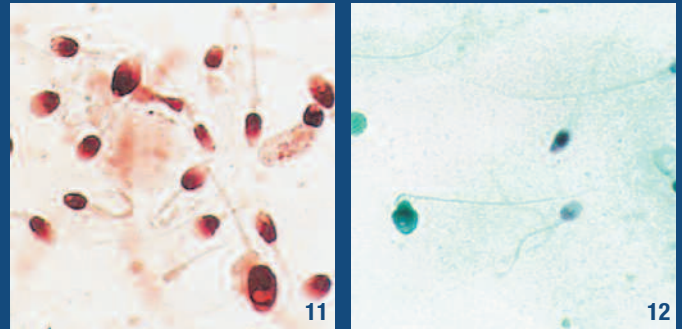
MORPHOLOGIE MALFORMATION DE LA RÉGION POSTACROSOMALE



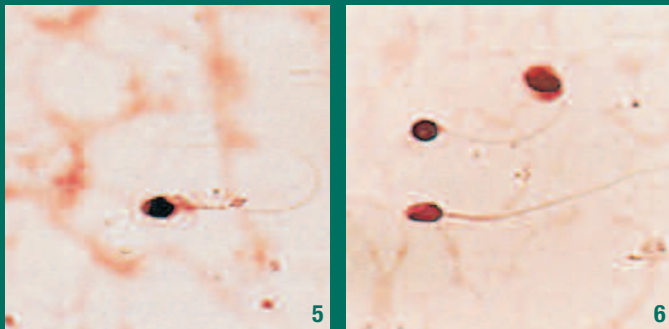
MORPHOLOGIE SPERMATOZOÏDES VACUOLÉS



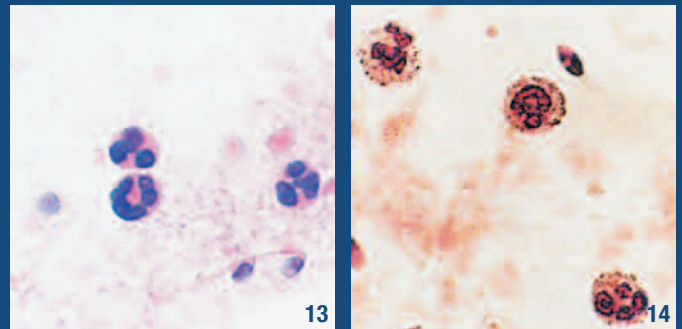
MORPHOLOGIE VARIATION DE LA TAILLE DES SPERMATOZOÏDES



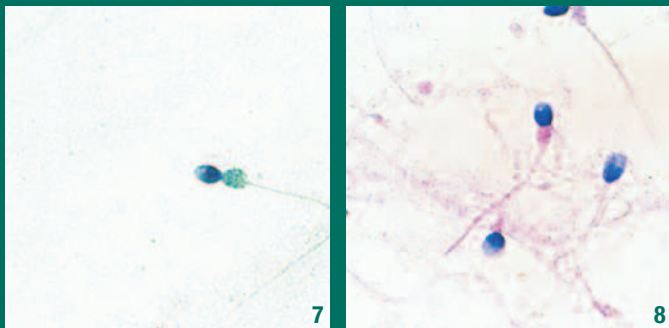
MORPHOLOGIE SPERMATOZOÏDES AVEC ANOMALIES ACROSOMALES



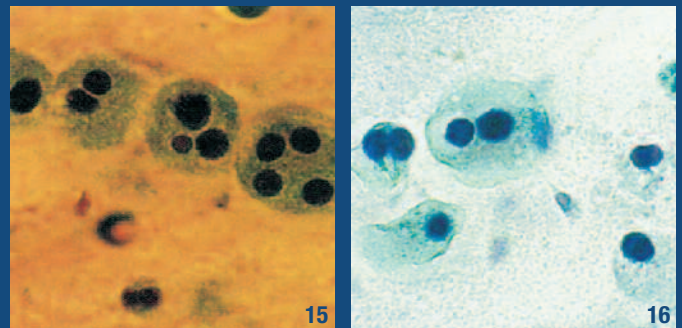
MORPHOLOGIE GLOBULES BLANCS



MORPHOLOGIE SPERMATOZOÏDES AVEC EXTRUSIONS CYTOPLASMIQUES



MORPHOLOGIE CELLULES IMMATURES



Source : Atlas of Sperm Morphology²

À titre indicatif, voici un tableau d'interprétation d'anomalies pouvant servir lors de l'interprétation d'un spermogramme :

Interprétation type d'un spermogramme			
Anomalies du nombre	>250 millions : 20 à 250 millions : 15 à 19 millions : 10 à 14 millions : 5 à 9 millions : 1 à 4 millions : < 1 million : 0 :	Polyzoospermie ----- Oligozoospermie Oligozoospermie Oligozoospermie Oligozoospermie Oligozoospermie Oligozoospermie Azoospermie	----- Normale Légère Importante Sévère Très sévère Extrême
Anomalies de la mobilité (en fonction du grade)	50 à 100 % : 35 à 49 % : 20 à 34 % : 10 à 19 % : 5 à 9 % : < 5 % :	----- Asthénozoospermie Asthénozoospermie Asthénozoospermie Asthénozoospermie Asthénozoospermie Asthénozoospermie	Normale Légère Importante Sévère Très sévère Extrême
Anomalies de la morphologie	15 à 100 % : 10 à 14 % : 5 à 9 % : 1 à 4 % : 0 %	----- Tératozoospermie Tératozoospermie Tératozoospermie Tératozoospermie	Normale Légère Importante Sévère Extrême
Association d'anomalies		Oligoasthénotératozoospermies de degrés divers	
Anomalies du volume	Absence : < 1,5 ml : > 6,0 ml :	Aspermie Hypospermie Hyperspermie	

L'interprétation des résultats d'un spermogramme :

Il faut prendre en considération plusieurs paramètres d'analyse du sperme (ex. : condition de collecte de l'échantillon, imperfection des mesures), mais aussi ceux qui sont liés aux fluctuations physiologiques du sperme comme le rythme des éjaculations, la saison, l'âge, la médication, le stress, le tabagisme et l'alcool, pour ne nommer que ceux-là.

Le spermogramme - postvasectomie

Objectifs :

- Déceler l'absence ou la présence de spermatozoïdes dans le sperme après une vasectomie;
- Procéder à toutes les étapes d'un spermogramme normal, c'est-à-dire volume, pH, apparence, liquéfaction;
- Faire un frottis sur une lame chargée (10 µl de sperme) et fixer au « cytospray » pour l'analyse de la morphologie;

- Faire un examen à l'état frais : examiner toute la lame (environ 300 champs);
- Si l'examen entre lame et lamelle est NÉGATIF, centrifuger pendant 10 minutes le sperme à 1 500 RPM, puis décanter et examiner le culot au microscope;
- Noter si d'autres composantes sont présentes (ex. : globules blancs, cellules épithéliales, débris, etc.).

Le spermogramme assisté par ordinateur

(Computer Assisted Semen Analysis ou CASA)

L'utilisation d'un système informatisé pour procéder à une analyse courante du sperme peut certainement être de mise en 2009. La mobilité, la linéarité et la vitesse des spermatozoïdes sont calculées à l'ordinateur, ce qui permet d'obtenir des résultats fiables et reproductibles. La préparation de l'échantillon à analyser doit être adéquate, la température du spécimen doit être maintenue à 37 degrés Celsius. Pour évaluer la concentration du sperme, il est parfois nécessaire de diluer le sperme dans un médium adéquat (par exemple : Earl's). Les normes déterminées par le fabricant et par le laboratoire doivent être suivies, respectées et maintenues⁴.

Un tel système peut certainement apporter des avantages par rapport à nos méthodes manuelles, tels que :

- Meilleure normalisation
- Plus grande précision
- Obtention rapide des résultats

Le test de fragmentation de l'ADN

Cette récente technique est moins connue que le spermogramme. Ce test mesure l'ADN des spermatozoïdes. La tête du spermatozoïde contient de l'ADN, c'est-à-dire le bagage génétique de l'individu. La fragmentation correspond à des ruptures des brins d'ADN. À un faible niveau, ces bris sont réparés par l'ovocyte après la fécondation. Au-delà d'un certain seuil de bris, le

processus de réparation ne peut plus se réaliser de façon satisfaisante pour permettre un développement normal de l'embryon. Cette détérioration de l'ADN est causée par un excès de radicaux libres. Ce test peut donc être un complément fort appréciable à tout le processus d'évaluation de la fertilité chez un homme.

Exemple de valeurs de référence :

- < 20 % : ADN de bonne qualité
- de 20 à 30 % : ADN hétérogène
- > 30 % : ADN très altéré

Conclusion

Le spermogramme est un examen qui gagnerait à être normalisé à l'échelle des laboratoires biomédicaux qui utilisent ces techniques. La précision et l'exactitude des résultats se traduiraient par de meilleurs suivis auprès du patient. Le présent document saura vous aider à perfectionner votre technique en ce qui concerne l'analyse du sperme en laboratoire.

Références

1. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, Fourth Edition, Cambridge University Press, 1999.
2. Atlas of Sperm Morphology: Marilyn Marx Adelman, Eileen M. Cahill, ASCP Press, Chicago, 1989. La permission de l'ASCP a été obtenue pour la reproduction des images contenues dans le présent article.
3. Le département de gynécologie-obstétrique et génétique médicale (DGOG) du CHUV. www.chuv.ch/dgo/dgo_home/umr/dgo_fer_conse

ils/dgo.../dgo.../dgo_fer_diagnostic_spermogramme.htm - 23k.

4. De Agostini A., Lucas, H. *Présentation sur les aspects biologiques de la fertilité masculine I*, Fondation Genevoise pour la formation et la recherche médicale, 2002.

Remerciements

Nous tenons à remercier les personnes suivantes qui ont collaboré à la révision de cet article : Dr Pierre Miron, MD, PhD(c), FRCS(c), Professeur adjoint de clinique, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal, Dr Roland R. Tremblay, DSc, MD, PhD, Directeur du laboratoire d'andrologie du CHUL ainsi que M. Pascal Des Rosiers, MSc, Directeur des laboratoires de FIV et dépistage de PROCREA Cliniques.

Éditeur

L'Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec
281, av. Laurier Est
Montréal (Québec) H2T 1G2
Tél. : 514 527-9811 OU 1 800 567-PROF
Télec. : 514 527-7314
Courriel : info@optmq.org
Site Internet : www.optmq.org

Gestion

Le Comité des communications

Rédaction

Anne-Marie Martel, T.M.
Jean-François Loïselle

Conception et infographie

Imagik design communications

Impression

Imprimerie GG Inc.

Abonnement annuel : 37 \$

Dépôt légal 1^{er} trimestre 2009
ISSN1207-2311
ISSN1916-9493 (version en ligne)

Numéro de convention de la
Poste-publication 40012566

Une nouvelle image graphique

Dans le cadre de ses nouvelles orientations stratégiques, l'Ordre renouvelle son image graphique. En effet, après plus de vingt ans, nous remercions l'ancien logo pour ses services rendus et le remplaçons par une nouvelle application graphique plus contemporaine et plus dynamique. Ce nouveau logo met en vedette les technologistes médicaux, et ce, par l'utilisation des initiales professionnelles T.M. au centre d'un cercle moléculaire. L'utilisation de la couleur verte offre une transition conservant une référence avec l'ancien logo vers le nouveau et le bleu permet également de faire ressortir davantage technologistes médicaux de l'ensemble. De plus, vous aurez remarqué une nouvelle grille graphique pour votre Sommaire scientifique, de même que vous en avez eu l'occasion de la constater pour le Sommaire.

Jean-François Loïselle
Responsable des communications

Questionnaire

Sommaire Scientifique - Février 2009 LE SPERMOGRAMME

Dans le cadre du programme de formation continue de l'Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec, la lecture d'articles scientifiques est considérée comme une activité de formation. La lecture du présent sommaire scientifique compte pour 0,5 heure de formation continue. Vous pourrez ensuite l'inscrire à votre carnet de bord.

Ci-joint, une liste de questions basées sur l'article présenté. Nous vous invitons à répondre à ce questionnaire et 0,5 heure de formation continue additionnelle vous sera accordée. Si vous choisissez cette option, ce questionnaire devra être conservé avec votre carnet de bord.

Bonne lecture!

Question : Combien de temps le patient dispose-t-il pour apporter son échantillon au laboratoire si la collecte fut effectuée à domicile?

Réponse : _____

Question : Veuillez décrire la mobilité observée d'un spermatozoïde de grade B.

Réponse : _____

Question : Que signifie la présence d'un spermatozoïde de couleur rouge lors d'une coloration à l'éosine-nigrosine?

Réponse : _____

Question : Nommer trois fluctuations physiologiques qui peuvent affecter le résultat du spermogramme.

Réponse : _____

Question : Nommer trois anomalies de la tête des spermatozoïdes qui peuvent être recensées selon la classification de Kruger.

Réponse : _____

Nom : _____

Numéro de membre : _____

Date de la lecture : _____