

L' AQS (Analyseur de la Qualité du Sperme) : Evaluation de son intérêt pour l'analyse, la sélection et la congélation des spermatozoïdes

J. AUGER

Service d'Histologie Embryologie, Biologie de la Reproduction et CECOS Groupe Hospitalier Cochin Port-Royal, 123 Boulevard de Port-Royal, 75014 Paris

RESUME

Le Sperm Quality Analyzer ou "Analyseur de la qualité du sperme" (AQS) dispositif récemment proposé pour l'évaluation objective de la qualité du sperme humain repose sur un principe physique simple : la mesure des variations de densité optique (DO) résultant du mouvement des spermatozoïdes. Les variations de DO sont mesurées à l'aide d'un capteur électro-optique. Les signaux analogiques produits sont convertis en signaux numériques et analysés par un microprocesseur. Le résultat de cette analyse est synthétisé sous la forme d'une valeur unique appelée index de mobilité du sperme (IMS). Dans la présente étude, nous avons testé la reproductibilité des mesures faites par l'AQS et nous avons évalué l'intérêt potentiel de ce nouvel outil pour le laboratoire de biologie de la reproduction et les activités de congélation des spermatozoïdes humains. On peut conclure que la mesure de l'IMS est simple, très reproductible et très utile pour juger de la qualité globale d'un sperme. Elle peut apporter une aide précieuse pour définir la méthode adéquate de préparation du sperme en vue d'une AMP et présente une valeur prédictive assez bonne du rendement des méthodes de

sélection des spermatozoïdes. La mesure de l'IMS à partir de spermatozoïdes congelés est également reproductible. Elle est très corrélée avec le nombre de spermatozoïdes mobiles par paillette (NSMP) mais présente l'avantage d'être une mesure objective et donc plus précise. L'IMS mesuré sur le sperme frais présente une valeur prédictive non négligeable de la tolérance à la congélation. La mesure de l'IMS serait certainement très utile pour le contrôle de qualité des paillettes et pour tout protocole d'étude de la congélation (modification de technique, de cryoprotecteur,...). Des études prospectives sont maintenant nécessaires pour rechercher si cet index comporte également une valeur prédictive de la fertilité in vivo, in vitro et de la fécondance des spermatozoïdes congelés.

Mots-clés : Sperme, mobilité, spermatozoïde, infertilité masculine.

INTRODUCTION

La concentration spermatique mais surtout le pourcentage de spermatozoïdes mobiles sont des indicateurs reconnus de la fertilité humaine [11, 9]. La première caractéristique est évaluée de manière semi-quantitative par des méthodes hémocytométriques. Par contre, l'évaluation de la mobilité est particulièrement

imprécise. Elle se caractérise principalement par sa subjectivité [16] illustrée par de grands écarts intra et inter-laboratoires [4, 13].

Dans les deux dernières décennies, des approches variées ont été proposées pour améliorer l'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes. On distingue deux grands types d'approches : celles reposant sur des principes physiques telle la turbidimétrie [15] ou la vélocimétrie laser-doppler [10] et celles reposant sur l'analyse d'images obtenues par microphotographie [12], microcinématographie [7, 5] ou microvidéographie [3]. Les systèmes de microvidéographie assistée par ordinateur (Cellsoft, Hamilton, Celltrak, ATS,...) reposant sur ce dernier principe sont très utilisés actuellement. Ils permettent outre la mesure du pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de la concentration, de calculer un certain nombre de caractéristiques liées à la vigueur de déplacement cellulaire (VCL, VAP, VSL) et à la forme de la trajectoire (LIN, ALH, STR, WOB) [14]. Ces systèmes, à condition de les utiliser avec une grande rigueur, sont très utiles pour la recherche mais aussi au laboratoire d'andrologie pour l'exploration de la fonction cinétique. Cependant, précision et reproductibilité ne sont obtenues qu'au prix d'un investissement intellectuel non négligeable. L'interaction utilisateur/machine est très importante. Aussi la qualité des mesures faites dépend largement du temps que l'utilisateur aura passé à comprendre le fonctionnement du système puis à standardiser son analyse pour optimiser chacune des étapes critiques, ces machines n'étant en aucun cas des automates "clé en main" [1]. De plus, leur coût les rendent encore prohibitifs pour de nombreux laboratoires.

La plupart des méthodes basées sur des principes physiques sont généralement considérées comme moins intéressantes car les données qu'elles fournissent se rapportent à l'ensemble de la population cellulaire; en d'autres termes, elles ne permettent pas d'accéder aux paramètres individuels de la cellule. Pourtant, une méthode physique comme la vélocimétrie laser doppler fournissant un certain nombre de

paramètres de population potentiellement intéressants d'un point de vue bioclinique (concentration, vitesse caractéristique, distribution des vitesses, pourcentage de spermatozoïdes mobiles) a complètement été supplantée par les méthodes basées sur l'analyse des images vidéos dès l'apparition sur le marché de systèmes fondés sur ce principe.

Le Sperm Quality Analyzer ou 'Analyseur de la qualité du sperme' (AQS) est un dispositif proposé au début des années 90 pour l'évaluation objective de la qualité du sperme humain [2]. Il repose sur un principe physique simple : la mesure des variations de densité optique (DO) résultant du mouvement des spermatozoïdes. Les variations de DO sont mesurées à l'aide d'un capteur électro-optique. Les mesures sont effectuées en plusieurs points de la chambre d'analyse (capillaire de 300 μm d'épaisseur contenant un très faible volume de sperme). Les signaux analogiques produits sont convertis en signaux numériques et analysés par un microprocesseur. Le résultat de cette analyse est synthétisé sous la forme d'une valeur unique appelée index de mobilité du sperme (IMS). De manière schématique, plus la fréquence des pics de DO est élevée plus l'index est élevé. Il a été montré précédemment que l'IMS est une mesure globale intégrant concentration, % de spermatozoïdes mobiles et qualité du mouvement (Baartov). L'intervalle des mesures de l'IMS se situe entre 0 et 450. Une étude récente a suggéré l'intérêt probable de cette mesure, d'un point de vue diagnostique et pronostique [8].

Dans l'étude présente nous avons testé la reproductibilité des mesures faites par l'AQS et nous avons évalué l'intérêt potentiel de ce nouvel outil pour le laboratoire de biologie de la reproduction et les activités de congélation des spermatozoïdes humains.

EVALUATION ET INTERET DE L'AQS POUR LE LABORATOIRE DE BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

La reproductibilité de la mesure de l'IMS a tout d'abord été testée à partir d'échan-

Tableau 2 : Valeurs de l'IMS et des caractéristiques du sperme dans le sperme frais et après sélection sur gradient de Percoll (n=16)

Caractéristique étudiée	Avant sélection	Après sélection	Différence statistique*
IMS	88 ± 92	159 ± 173	< 0,02
Concentration (x 10 ⁶ spermatozoïdes/ml)	40 ± 56	31 ± 46	NS
Mobilité (%)	29 ± 13	59 ± 26	< 0,001
Formes normales (%)	46 ± 17	62 ± 19	< 0,01

* test de Wilcoxon sur série appariée

Commentaire : L'augmentation significative de l'IMS après sélection rend bien compte du gain global obtenu après sélection. Cependant l'IMS est moins discriminant que d'autres variables, la mobilité par exemple, ce qui est normal puisque l'IMS intègre des concentrations et des mobilités variées. C'est justement le caractère global de cet index qui est probablement plus intéressant ici. La figure 1 montre bien la variabilité des rendements de la sélection par une méthode identique pour tous les spermés testés. A noter, dans 3 cas où l'IMS initial était égal à 0 (très faible concentration de spermatozoïdes mobiles), sa valeur restait la même après sélection dans 2 cas et augmentait seulement à 8 dans le dernier cas.

Tableau 3 : Relation entre IMS et caractéristiques initiales du sperme (n=45).

Caractéristiques	Valeur du coefficient de corrélation r	Signification statistique
IMS x Concentration	0,83	p < 0,001
IMS x % de spermatozoïdes mobiles ('a'+b')	0,75	p < 0,001
IMS x Concentration de spermatozoïdes mobiles	0,82	p < 0,001
IMS x % de spermatozoïdes normaux	0,68	p < 0,001
IMS x Concentration de cellules rondes	0,36	p < 0,02

Commentaire : Les 3 premières corrélations sont évidentes compte-tenu du principe de mesure. La corrélation de l'IMS avec le % de formes normales est moins évidente et découle probablement de la relation connue entre mobilité et morphologie normale. Enfin, on observe que la concentration de cellules rondes influence la valeur de l'IMS. Cependant l'étude en régression multiple de l'effet conjoint de la concentration, de la mobilité et de la concentration de cellules rondes sur la valeur de l'IMS n'indique pas une intervention significative de cette variable dans la valeur de l'IMS. Les figures qui suivent précisent les relations existant entre IMS d'une part et les diverses caractéristiques spermatiques étudiées d'autre part.

Tableau 4 : Relation entre IMS initial et caractéristiques spermatiques après sélection sur gradient de percoll (n=16).

Caractéristiques	Valeur du coefficient de corrélation r	Signification statistique
IMS x % de spermatozoïdes mobiles ('a'+b')	0,79	p < 0,001
IMS x Concentration de spermatozoïdes mobiles	0,89	p < 0,001
IMS x % de spermatozoïdes normaux	0,57	NS

Commentaire : Il existe une bonne corrélation entre la valeur initiale de l'IMS et la concentration finale en spermatozoïdes mobiles. La figure suivante montre que les écarts possibles de l'IMS pour une concentration post-sélection donnée sont beaucoup plus étroits que dans la corrélation directe IMS x concentration initiale en spermatozoïdes mobiles. En d'autres termes, pour la série étudiée, l'IMS initial présente une bonne valeur prédictive du rendement final de la sélection.

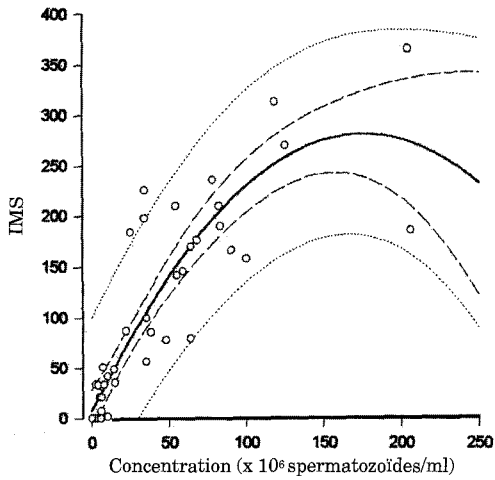


Figure 2 : IMS x Concentration de spermatozoïdes.

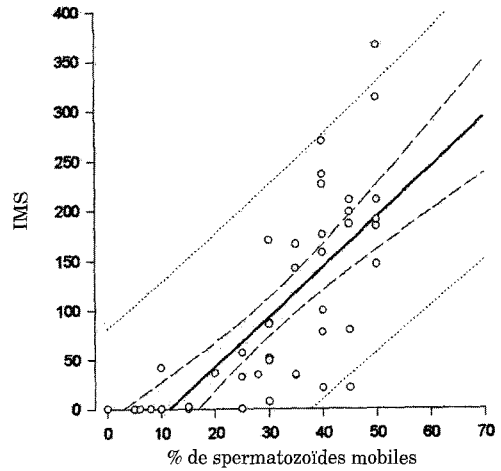


Figure 3 : IMS x % de spermatozoïdes mobiles.

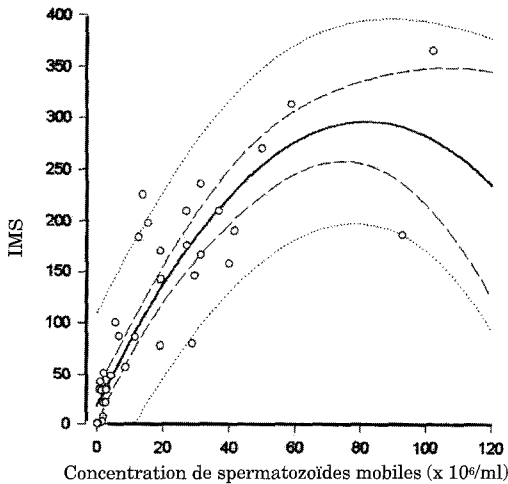


Figure 4 : IMS x concentration de spermatozoïdes mobiles.

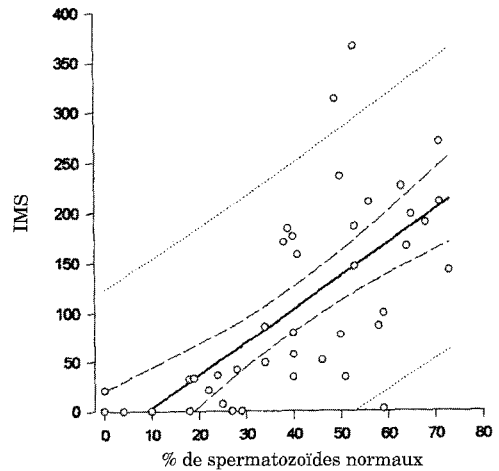
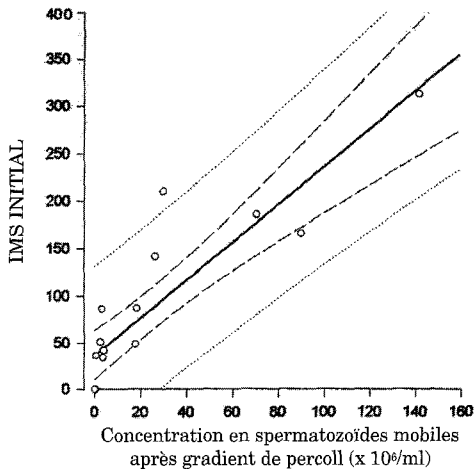


Figure 5 : IMS x % de spermatozoïdes normaux.

Commentaire : Bien que les corrélations de l'IMS avec chacune des caractéristiques étudiées soient bonnes, les nuages de points sont très étalés : par exemple, des valeurs d'IMS comprises entre 25 et 275 correspondent à une mobilité de 40%. On voit que la corrélation est meilleure et les écarts d'IMS plus réduits lorsque la variable spermatique intègre concentration et mobilité (concentration de spermatozoïdes mobiles).



<--

Figure 6 : IMS initial x concentration de spermatozoïdes mobiles après sélection.

Au total, à partir de cette étude préliminaire, il apparaît que la mesure de l'IMS est simple, très reproductible et très utile pour juger de la qualité globale d'un sperme. Elle peut apporter une aide précieuse pour définir la méthode adéquate de préparation du sperme en vue d'une AMP et présente une valeur prédictive assez bonne du rendement de la méthode de sélection.

Des études prospectives sont nécessaires pour rechercher si cet index comporte également une valeur prédictive de la fertilité in vivo et in vitro.

EVALUATION ET INTERET DE L'AQS POUR LES ACTIVITES DE CONGELATION DES SPERMATOZOÏDES HUMAINS

La reproductibilité de la mesure de l'IMS sur paillette décongelée étudiée sur 3 paillettes de qualités variées (3 mesures pour chaque) était similaire à celle mesurée sur échantillon de sperme frais (CV ≤ 5%). Il semble donc que le caractère très hétérogène du sperme après dilution avec le milieu cryoprotecteur, congélation et décongélation ne perturbe pas les mesures répétées de l'IMS.

A partir de spermatozoïdes de donneurs féconds, nous avons pu répondre à une question souvent posée par les gynécologues qui pratiquent des inséminations ou des fécondations in vitro recourant à des paillettes : celle de la variation de qualité inter-paillette d'un même éjaculat après décongélation qui pour certains serait très importante.

Tableau 5 : Variabilité de qualité inter-paillette mesurée par l'IMS sur 2 éjaculats de caractéristiques différentes.

éjaculat n°1 (NSMP* = 3,2)		éjaculat n°2 (NSMP = 11,1)	
n° paillette	IMS	n° paillette	IMS
1	58		
2	49		
3	57		
4	72	1	240
5	63	2	170
6	73	3	206
7	56	4	194
8	52	5	200
9	76	6	174
10	65	7	162
11	55	8	176
12	70	9	178
13	66	10	162
Moyenne ± écart-type	62 ± 8	Moyenne ± écart-type	186 ± 23
CV (%)	13,3	CV (%)	12,3

* NSMP : nombre de spermatozoïdes mobiles par paillette (x10⁶)

Commentaire : La variabilité de qualité inter-paillette évaluée par la mesure de l'IMS (après un réchauffement de 5 minutes à température ambiante sur deux éjaculats complets) était faible, le coefficient de variation étant dans les 2 cas inférieur à 15%.

La relation entre IMS sur la paillette après dégel et NSMP (nombre de spermatozoïdes par paillette) calculé a été étudiée à partir de 24 paillettes de qualités variées devant être détruites. La corrélation était excellente (r = 0,93 ; p < 0,001) comme en témoigne la figure 7.

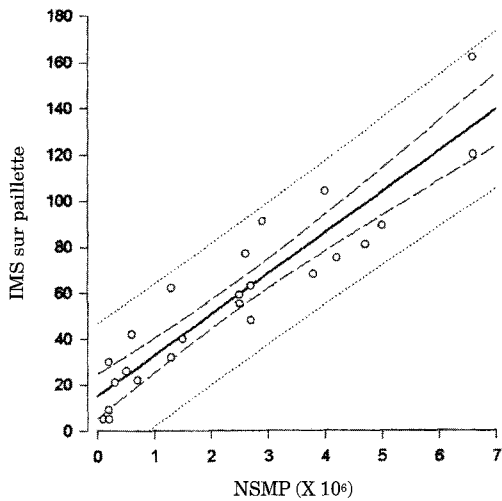


Figure 7 : Relation entre IMS sur paillette et NSMP.

Commentaire : Pour apprécier la qualité d'une paillette, l'IMS est certainement plus précis que le calcul du NSMP car il s'agit d'une mesure et non d'un calcul indirect approximatif (subjectivité de l'évaluation de la mobilité, approximation du calcul de la concentration après dilution à partir de l'évaluation de la concentration initiale et du volume réel de sperme dans la paillette).

L'intérêt de l'IMS pour évaluer la tolérance à la congélation et le rôle de la dilution avec le milieu cryoprotecteur puis de la congélation dans les vapeurs d'azote liquide à -196°C a été étudié à partir du sperme de 22 donneurs féconds et de 34 patients venus conserver leur sperme avant un traitement antitumoral à risque stérilisant.

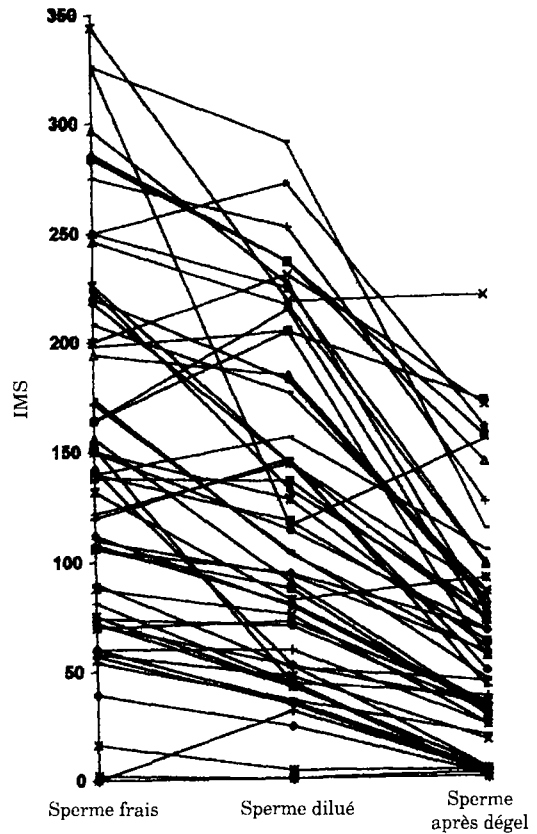
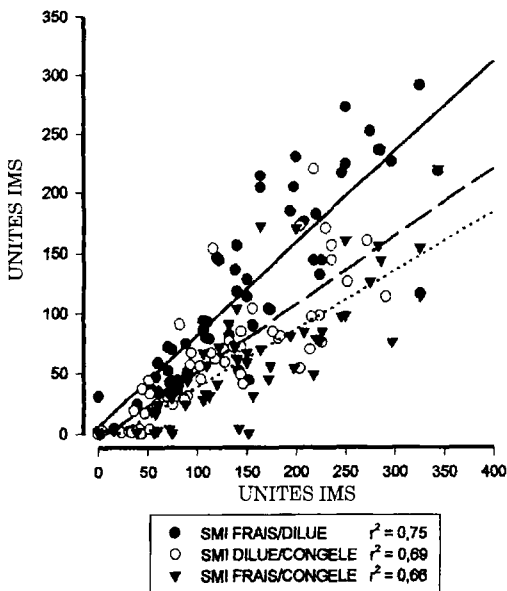


Figure 8 : Evolution de l'IMS des donneurs et des patients, sur le sperme frais, après dilution avec le cryoprotecteur et après congélation décongélation.

Commentaire : Il existe une baisse moyenne de 25% de l'IMS après dilution pour la majorité des spermes probablement en relation avec le changement de concentration. Certains spermes accusent une chute importante qui pourrait correspondre à un choc osmotique. Pour d'autres au contraire un gain est noté : il pourrait s'agir de spermes visqueux pour lesquels la dilution améliore la mobilité. La baisse de l'IMS entre dilution et dégel est de l'ordre de 50%. Pour certains des spermes, la baisse de l'IMS est faible ($< 25\%$) suggérant une très bonne tolérance à la congélation.

<--

Figure 9 : Evolution de l'IMS en fonction de la dilution dans le milieu cryoprotecteur.

Tableau 6 : Valeurs de l'IMS (avant dilution, après dilution et après congélation/réchauffement) et des caractéristiques du sperme frais et congelé pour les deux groupes d'hommes étudiés.

Paramètre étudié	Population totale n = 56	Donneurs n = 22	Patients n = 34	Différence statistique
IMS initial (1)	148 (88)	187 (88)	123 (80)	< 0,01
IMS dilution (2)	119 (78)	151 (77)	98 (71)	< 0,02
IMS congélation (3)	62 (53)	91 (61)	43 (36)	< 0,005
% (2) / (1)	77 (26)	81 (23)	74 (28)	NS
% (3) / (2)	47 (27)	55 (30)	43 (24)	< 0,05
% (3) / (1)	38 (22)	45 (24)	32 (18)	< 0,01
Concentration (x 10 ⁶ sperm./ml)	100 (96)	122 (73)	86 (108)	< 0,01
Formes normales (%)	44 (17)	55 (13)	37 (16)	< 0,001
Mobilité initiale (%)	46 (14)	53 (11)	42 (15)	< 0,01
Mobilité après dégel (%)	24 (14)	32 (15)	18 (11)	< 0,001
Récupération (%)	48 (21)	58 (21)	42 (20)	< 0,005
NSMP (x10 ⁶)	2,4 (2,4)	3,8 (2,7)	1,5 (1,6)	< 0,001

Commentaire : L'IMS rend bien compte des différences de qualité globale des spermatozoïdes de donneurs et de patients aussi bien avant qu'après congélation.

Tableau 7 : Relation entre IMS initial et paramètres spermatozoïdiques avant et après congélation (n = 56).

Corrélations	valeur du coefficient r	signification
IMSxconcentration	0,51	p < 0,001
IMSxmobilité ('a'+ 'b')	0,49	p < 0,001
IMSxmobilité ('a'+ 'b') après dégel	0,66	p < 0,001
IMSxNSMP	0,75	p < 0,001
IMSx% récupération de la mobilité	0,62	p < 0,001

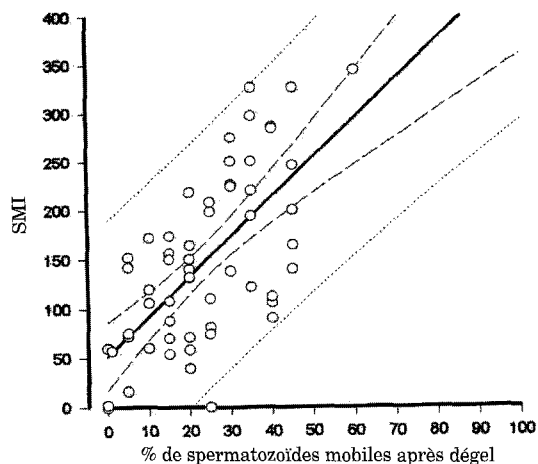


Figure 10 : Relation entre IMS initial et mobilité après dégel.

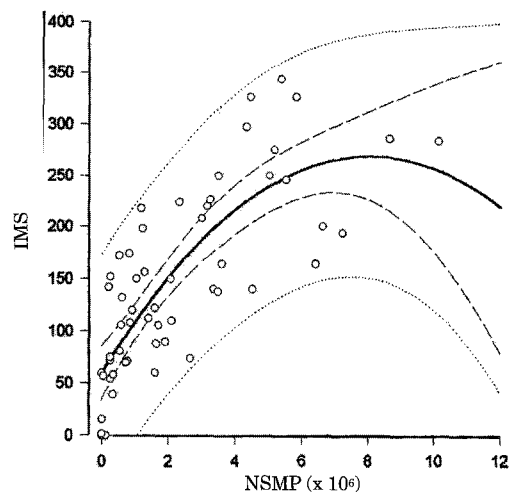


Figure 11 : Relation entre IMS initial et NSMP.

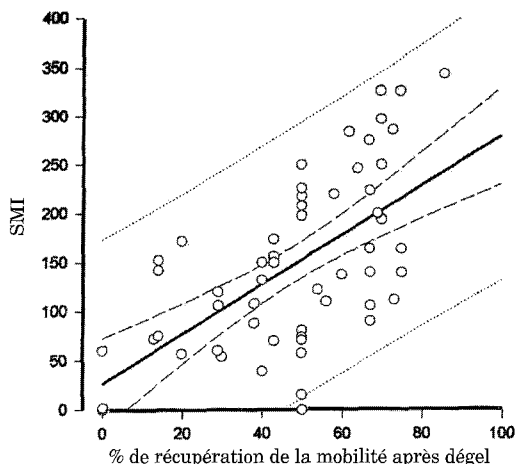


Figure 12 : Relation entre IMS initial et % de récupération de la mobilité après dégel.

Commentaires : La valeur initiale de l'IMS sur le sperme frais est corrélée à 3 paramètres indicateurs de la tolérance à la congélation : le % de spermatozoïdes mobiles après dégel, le NSMP et le % de récupération de la mobilité après dégel. Cependant, pour une valeur donnée de mobilité correspond un intervalle d'IMS large : par exemple, pour une mobilité après dégel égale à 20%, l'IMS était compris entre 30 et 220. La corrélation est meilleure avec le NSMP surtout si l'on tient compte des catégories usuelles de NSMP se référant au potentiel fécondant des paillettes :

Classe de NSMP	Intervalle de confiance pour l'IMS initial
< 0,5	60-100
0,5 - < 2	130-170
≥ 2	190-240

Un IMS initial <100 prédit un NSMP < 2 dans 95% des cas. Un IMS initial supérieur à 200 prédit un NSMP >2 dans 95% des cas. La zone de recouvrement ne permettant pas une prédiction très bonne est comprise entre 100 et 200. Malgré tout, dans cette zone 65% des spermatozoïdes aboutissent après congélation à une valeur de NSMP < 2. En résumé, la mesure de l'IMS sur le sperme frais à une assez bonne valeur de prédiction de la tolérance à la congélation.

Au total la mesure de l'IMS sur le sperme congelé est reproductible. Elle est très corrélée avec le NSMP mais présente l'avantage d'être une mesure objective et donc plus précise. La valeur de l'IMS mesuré sur le sperme frais présente une valeur prédictive non négligeable de la tolérance à la congélation. Par ailleurs la mesure de l'IMS serait certainement très utile pour le contrôle de qualité des paillettes et pour tout protocole d'étude de la congélation (modification de technique, de cryoprotecteur, ...).

Comme dans le domaine du diagnostic, des études prospectives sont nécessaires pour rechercher si cet index comporte également une valeur prédictive de la fécondance des spermatozoïdes congelés.

REFERENCES

1. AUGER J : Mouvement des spermatozoïdes et analyse automatisée : rappels technologiques, biais méthodologiques possibles et conditions de mesure. *Andrologie* 1995 ; 5 : 37-45.
2. BARTOOV B, BEN-BARAK J, MAYEVSKY A et al. : Sperm motility index : a new parameter for human sperm evaluation. *Fertil Steril* 1991 ; 56 : 108-112.
3. BOYERS SP, DAVIS RO, KATZ DF. : Automated semen analysis. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil* 1989 ; 12 : 165-200.
4. COOPER TG, NEUWINGER J, BAHRS S, NIESCHLAG E : Internal quality control of semen analysis. *Fertil Steril* 1992 ; 58 : 172-178.
5. DAVID G, SERRES C, JOUANNET P : Kinematics of human spermatozoa. *Gamete Res* 1981 ; 4 : 83-95.
6. DIXON WJ : BMDP statistical software manual. Berkeley : University of California Press, 1988.
7. JANICK J, MAC LEOD J : The measurement of human spermatozoa motility. *Fertil Steril* 1970 ; 21 : 140.
8. JOHNSTON RC, CLARKE GN, LIU DY et al. : Assessment of the Sperm Quality Analyser. *Fertil Steril* 1995 ; 63 : 1071-1076.
9. JOUANNET P, DUCOT B, FENEUX D et al. : Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl* 1988 ; 11 : 379-394.

10. JOUANNET P, VOLOCHINE B, DEGUENT P et al. : Study of human spermatozoa mobility parameters by scattered light. *Prog. Reprod. Biol.* 1976 ; 1 : 28-35.
11. MAC LEOD J, GOLD RZ. : The male factor in fertility and infertility. *Fertil Steril* 1953 ; 4 : 10.
12. MAKLER A, TATCHER M, MOHILEVER J : Sperm semi-automatic analysis by a combination of multiple exposure photography (MEP) and computer techniques. *J Fertil* 1980 ; 25 : 62-66.
13. NEUWINGER J, BEHRE HM, NIESCHLAG E : External quality control in the andrology laboratory : an experimental multicenter trial. *Fertil Steril* 1990 ; 54: 308-314.
14. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. : Manuel de laboratoire de l'OMS pour l'analyse du sperme humain et de l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical. Paris, Editions INSERM, 1993.
15. SOKOLOSKI JE, BLASCO L, STOREY BT et al. : Turbidimetric analysis of human sperm motility. *Fertil Steril* 1977 ; 28 : 1337-1341.
16. WALKER JS, WINET H, FREUND M. : A comparison of subjective and objective sperm motility evaluation. *J Androl* 1982 ; 3 : 184-192.

ABSTRACT

The sperm quality analyzer : evaluation of its interest for the analysis, selection and freezing of human spermatozoa

J. AUGER

The sperm quality analyzer (SQA) is a device which has been recently proposed to make an objective measurement of human semen quality. It is based on a simple physical method : the measurement of optical density modifications induced by sperm movement. Optical density modification are measured through an electro-optical photo-receptor. Analogical signals produced

are transformed in numerical signals and analysed by a microprocessor. The result of the analysis is given in a unique value called « sperm motility index » (SMI).

In this study the reproducibility of the results got with the SQA has been measured and the interests of this new diagnostic technique for the andrological laboratory and for human sperm freezing have been evaluated. It can be conclude that SMI measurement is simple, well reproductive and very useful to evaluate the overall quality of a sample. The SMI allows a good prediction of the efficiency of the methods used to select spermatozoa so it can help to choose the best technique in order to prepare the spermatozoa for a medically assisted procreation.

Values of SMI after freezing and thawing of semen samples were also reproducible. They were well correlated to the number of motil sperm per straw as measured by conventional methods, SMI was more objective and accurate. From the value of SMI measured on fresh samples it was possible to predict the freezing tolerance. Therefore measurement of SMI could be very useful to check straws quality and in studies on human semen cryopreservation. Prospective studies are further needed to determine if the SMI could also predict «in vivo» fertility of IVF results and fertilizing ability of frozen thawed sperm.

Key words : Semen, spermatozoa, motility, male infertility